

Aus dem
Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Die hormonelle Induktion der zervikalen Erweichung beim
Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Christina Simon
aus Dessau

Leipzig, 2005

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Gotthold Gäbel

Betreuer: Prof. Dr. Almuth Einspanier

Gutachter: Prof. Dr. Almuth Einspanier
Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

Prof. Dr. Henry Alexander
Universitätsfrauenklinik (Triersches Institut)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

PD Dr. Claudia Binder
Universitätsklinikum
der Medizinischen Fakultät
der Universität Göttingen

Tag der Verteidigung: 10.05.2005

Dem Unerklärlichen in uns und über uns...

(aus einem Roman von Franz Werfel)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Die Zervix	3
2.1.1 Anatomie und Histologie	3
2.1.2 Die Funktion der Zervix	5
2.1.2.1 Die Aufgaben der Zervix im Zyklus	5
2.1.2.2 Die Aufgaben der Zervix während Gravidität und Geburt	5
2.1.3 Zervikal bedingte Pathologien während Gravidität und Geburt	6
2.1.4 Hormonelle Regulation der Geburt	6
2.1.5 Veränderungen in der Extrazellulären Matrix	8
2.1.6 Überblick über die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)	12
2.1.7 MMPs im Reproduktionstrakt	13
2.2 Hormone	14
2.2.1 Östradiol	14
2.2.1.1 Hormongruppe, Struktur und Synthese	14
2.2.1.2 Wirkungsmechanismen und Wirkungen	16
2.2.2 Progesteron	17
2.2.2.1 Struktur, Synthese und Wirkungen	17
2.2.3 Relaxin	19
2.2.3.1 Hormongruppe und Struktur	19
2.2.3.2 Synthese und Zirkulation	20
2.2.3.3 Wirkungsmechanismus	22
2.2.3.4 Wirkungen in den Zielorganen	23
2.3 Tiermodell Weißbüschelaffe	25
2.3.1 Allgemeine Angaben	25
2.3.2 Der Weißbüschelaffe als Modelltier in der reproduktionsbiologischen Forschung	26
3 Material und Methoden	30
3.1 Material	30
3.1.1 Versuchstiere	30
3.1.1.1 <i>In vivo</i> -Versuch	30
3.1.1.2 Versuchstiere für die <i>in situ</i> -Untersuchung von Zervix-Gewebe	31
3.1.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	34

3.2	Methoden	35
3.2.1	Kontrolle des reproduktiven Status der Tiere	35
3.2.2	Messung des Zervix-Innendurchmessers <i>in vivo</i>	35
3.2.3	Untersuchung der Organe	37
3.2.3.1	Bestimmung der Zervix-Nassgewichte	37
3.2.3.2	Anfertigen von Präparaten für die Histologie und Immunhistochemie	37
3.2.3.3	Histologie	37
3.2.3.3.1	Übersichtsfärbung mit Hämalaun und Eosin (H&E)	37
3.2.3.3.2	Eosinophilenfärbung mit Siriusrot	38
3.2.3.3.3	Trichrom-Färbung nach Masson	38
3.2.3.3.4	Färbung mit Pikrosiriusrot	39
3.2.3.4	Immunhistochemie zur Darstellung von Proteinen im Zervixgewebe (Hormonrezeptoren, Relaxin, Kollagenasen, Blutgefäße)	39
3.2.3.4.1	Vorbehandlung	40
3.2.3.4.2	Durchführung der immunhistochemischen Färbungen	40
3.2.3.5	Molekularbiologie	42
3.2.3.5.1	RNA-Präparation	42
3.2.3.5.2	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zum Nachweis von mRNA im Zervixgewebe (Hormonrezeptoren, Relaxin, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF))	43
3.2.3.5.2.1	cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA mittels reverser Transkription	43
3.2.3.5.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
3.2.3.5.3	Agarose-Gelelektrophorese	45
3.3	Auswertung	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Messung des Zervix-Innendurchmessers <i>in vivo</i>	47
4.2	Untersuchung der Organe	50
4.2.1	Bestimmung der Zervix-Nassgewichte	50
4.2.2	Histologische und immunhistochemische Untersuchungen	51
4.2.2.1	Histologie	51
4.2.2.1.1	Intakte, zyklische Tiere	52
4.2.2.1.2	Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere	54
4.2.2.1.3	Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere	54
4.2.2.2	Immunhistochemie	60
4.2.2.2.1	Immunhistochemische Darstellung der Steroidrezeptoren	60
4.2.2.2.1.1	Östradiolrezeptor	60
4.2.2.2.1.1.1	Intakte, zyklische Tiere	60
4.2.2.2.1.1.2	Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere	60
4.2.2.2.1.1.3	Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere	62
4.2.2.2.1.2	Progesteronrezeptor	62
4.2.2.2.1.2.1	Intakte, zyklische Tiere	62
4.2.2.2.1.2.2	Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere	62

4.2.2.2.1.2.3	Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere	62
4.2.2.2.2	Nachweis der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-7	64
4.2.2.2.2.1	Intakte, zyklische Tiere	64
4.2.2.2.2.2	Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere	64
4.2.2.2.2.3	Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere	64
4.2.2.2.3	Immunhistochemische Darstellung des Relaxinrezeptors LGR7	66
4.2.2.2.3.1	Intakte, zyklische Tiere	66
4.2.2.2.3.2	Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere	66
4.2.2.2.3.3	Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere	66
4.2.2.2.4	Nachweis von Relaxin	68
4.2.2.2.4.1	Intakte, zyklische Tiere	68
4.2.2.2.4.2	Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere	68
4.2.2.2.4.3	Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere	68
4.2.2.2.5	Immunhistochemische Darstellung von Aktin	70
4.2.2.2.5.1	Intakte, zyklische Tiere	70
4.2.2.2.5.2	Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere	70
4.2.2.2.5.3	Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere	71
4.2.2.2.6	Immunhistochemischer Nachweis von ausgewählten Matrix-Metalloproteinasen	73
4.2.2.2.6.1	MMP-1	74
4.2.2.2.6.1.1	Intakte, zyklische Tiere	74
4.2.2.2.6.1.2	Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere	74
4.2.2.2.6.1.3	Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere	74
4.2.2.2.6.2	MMP-2	76
4.2.2.2.6.2.1	Intakte, zyklische Tiere	76
4.2.2.2.6.2.2	Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere	76
4.2.2.2.6.2.3	Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere	76
4.2.2.2.6.3	MMP-9	78
4.2.2.2.6.3.1	Intakte, zyklische Tiere	78
4.2.2.2.6.3.2	Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere	78
4.2.2.2.6.3.3	Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere	78
4.2.3	Molekularbiologische Untersuchungen	81
4.2.3.1	Intakte, zyklische Tiere	81
4.2.3.2	Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere	82
4.2.3.3	Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere	82
5	Diskussion	85
5.1	Physiologische Situation	85
5.2	Lokale Applikation von rekombinantem humanen (rh)Relaxin	89
5.2.1	Messung des Zervix-Innendurchmessers <i>in vivo</i>	89
5.2.2	Untersuchung von Organen nach lokaler Applikation von rhRelaxin	90
5.3	Untersuchung von Organen systemisch hormonbehandelter Tiere	93
5.3.1	Systemische Behandlung mit 17 β -Östradiol	93
5.3.2	Systemische Behandlung mit rhRelaxin	96

5.3.3	Systemische Behandlung mit Östradiol und Relaxin in Kombination	99
5.4	Schlussbetrachtung	101
6	Zusammenfassung	103
7	Summary	105
8	Literaturverzeichnis	107
9	Anhang	A
	Danksagung	D

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
CG	Choriongonadotropin
C.I.	Corpus luteum
cm	Zentimeter
d	Tag
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPZ	Deutsches Primatenzentrum
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E ₂	Östradiol bzw. mit Östradiol behandelte Gruppe
E ₂ +RLX	mit Östradiol und Relaxin behandelte Gruppe
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER α	Östradiolrezeptor α
ER β	Östradiolrezeptor β
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
fLP	frühe Lutealphase
for	vorwärts (englisch: forward)
FP	Follikelphase
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm

GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
G-Protein	Guanosintriphosphat-Bindungsprotein
h	Stunde
hCG	humanes Choriongonadotropin
H&E	Hämalaun-Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettich-Peroxydase (englisch: horseradish-peroxydase)
17βHSD	17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
i.d.R.	in der Regel
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
INSL3	Insulin-ähnlicher Faktor 3 (gleichzusetzen mit RLF)
K	Kontrollgruppe
kDa	Kilodalton
LGR7	Relaxinrezeptor (englisch: Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor)
LH	Luteinisierendes Hormon
LP	Lutealphase
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Boten-RNA (englisch: messenger RNA)
MW	arithmetischer Mittelwert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
n	Anzahl der Stichproben
NH ₄	Ammoniak
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid

ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
Nr.	Nummer
n.s.	nicht signifikant
OV	Ovariectomie
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAF-AH	PAF-Acetylhydrolase
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction)
PDE	Phosphodiesterase
pg	Pikogramm
PGE	Prostaglandin E
PGF2 α	Prostaglandin F2 α
pH	pondus Hydrogenii
pmol	Pikomol
Poly-A	Polyadenosin
p.ov.	post ovulationem
PR	Progesteronrezeptor
rev	rückwärts (englisch: reverse)
rh	rekombinant human
RLF	Relaxin-ähnlicher Faktor (gleichzusetzen mit INSL3)
RLT-Puffer	Lyse-Puffer im RNeasy-Midi-Kit
RLX	Relaxin bzw. mit Relaxin behandelte Gruppe
RNA	Ribonukleinsäure
RPE-Puffer	Fällungspuffer im RNeasy-Midi-Kit
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch: rounds per minute)
RT-Puffer	Reverse-Transkriptase-Puffer im cDNA-Synthese-Mix
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
RW1-Puffer	Waschpuffer im RNeasy-Midi-Kit
SD	Standardabweichung
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sFP	späte Follikelphase
sLP	späte Lutealphase
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TK	Tyrosinkinase
TIMP	Kollagenaseinhibitor (englisch: tissue inhibitor of matrix metalloproteinases)
TRH	Thyreotropin-Releasing Hormon

- VIII -

Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tPA	Gewebe-Plasminogenaktivator (englisch: tissue plasminogen activator)
u.	und
u.a.	unter anderem
u.ä.	und ähnliches
u.s.w.	und so weiter
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
%	Prozent

1 Einleitung

Der Gebärmutterhals (Zervix) spielt als kaudaler bzw. unterer Anteil des Uterus eine wichtige Rolle während der Gravidität und Geburt. Über den gesamten Zeitraum der Gravidität hat er die Aufgabe eines uterinen Verschlussapparates, indem er das intrauterine Milieu und damit den Embryo bzw. Fetus vor äußeren Einflüssen wie z.B. Infektionen schützt. Gleichzeitig ist es die Aufgabe der Zervix, den Konzeptus bis zur Geburt im Uterus zurückzuhalten, wofür ein fester, geschlossener Zustand des Organs notwendig ist. Im Gegensatz dazu muss die Zervix zum Zeitpunkt der Geburt in relativ kurzer Zeit erweichen und sich erweitern können, damit die Frucht den Geburtskanal passieren kann (LEPPERT 1995; DANFORTH 1983). Die dafür notwendigen, extremen Veränderungen des Gewebes werden gewährleistet durch komplexe, geweberemodulierende Vorgänge, die v.a. die Extrazelluläre Matrix und hier insbesondere die kollagenen Fasern betreffen (IWAHASHI et al. 2003; ELLWOOD 1980; JUNQUEIRA et al. 1980). Die ablaufenden Prozesse stehen unter endokriner Kontrolle von Hormonen wie den Steroiden Östrogen und Progesteron, den Prostaglandinen sowie Peptidhormonen wie Oxytozin und Relaxin (LENHARDT et al. 2001; LINDZEY u. KORACH 1999; BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994; SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 1991). Hormonelle Imbalancen sind eine mögliche Ursache für eine Beeinträchtigung der Funktion dieses Organs. Solche zervikalen Dysfunktionen können zu Störungen der Gravidität (insuffiziente Zervix) und der Geburt (unreife Zervix) führen (LEPPERT 1995; RATH et al. 1994).

Zu den in der Zervix ablaufenden Mechanismen der Erweichung und Erweiterung des Gewebes und deren Regulation findet man in der Literatur verschiedene Informationen. Mit den sich teilweise auch widersprechenden Ergebnissen konnten einige Bereiche dieser komplexen Vorgänge bei Tier und Mensch beleuchtet werden, wobei der gesamte Ablauf noch nicht vollständig geklärt ist. Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Arbeit ein Überblick über die Wirkung ausgewählter Hormone auf die Zervix des Weißbüschelaffen erarbeitet werden. Um das Spektrum der zu untersuchenden Hormone für diese Arbeit zu begrenzen, wurden das Steroidhormon Östradiol sowie das Peptidhormon Relaxin ausgewählt, da beide Hormone einen Einfluss auf das Bindegewebe des Reproduktionstraktes besitzen.

Das Hormon Relaxin wurde zu Beginn des letzten Jahrhunderts an Meerschweinchen entdeckt (HISAW 1926). Seine namensgebende „relaxierende“ Wirkung bezieht sich auf die Relaxation der Beckensymphyse bzw. die Verlängerung des bindegewebigen Schambein-Symphysenbandes, als dessen klassischer Nachweis der Maus-Bioassay gilt (BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994). Aufgrund einer Assoziation der Wirkungen dieses Hormons v.a. mit dem weiblichen Reproduktionstrakt galt das Relaxin lange Zeit als typisches „Schwangerschaftshormon“. In den letzten Jahren sind allerdings sowohl eine Synthese im als auch eine Wirkung auf das Gewebe anderer Organe wie Herz, Lunge und Niere sowie das Gehirn festgestellt worden (BATHGATE et al. 2003; DU et al. 2003; SAMUEL et al. 2003b; DSCHIETZIG et al. 2001; GARBER et al. 2001). Schon beim klassischen Maus-Bioassay wird Relaxin im Zusammenhang mit Östrogenen erwähnt, denn für den Nachweis der Wirkung des Peptidhormons sind mit Östrogenen vorstimulierte Tiere verwendet worden (BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994). Die Östrogene spielen sowohl im Zyklus als auch während der Gravidität und Geburt eine wichtige Rolle im

Reproduktionstrakt (PETRIDES 1998b). Die Wirkung des Östradiols auf dessen Bindegewebe wird v.a. durch eine Ödematisierung der Extrazellulären Matrix beschrieben (DÖCKE 1994).

Die meisten Untersuchungen zu möglichen Mechanismen der Geweberemodulierung und dem Einfluss von Hormonen im Reproduktionstrakt fanden bisher an Nagetieren und Schweinen statt. Auf dem Gebiet der humanen Reproduktionsbiologie steht Gewebematerial v.a. aus ethischen Gründen nur sehr begrenzt zur Verfügung, weshalb vornehmlich an Zellkultur-Modellen gearbeitet wurde. Aufgrund der speziesspezifischen Unterschiede auch in der Endokrinologie des Reproduktionstraktes bieten sich besonders Primaten in der Forschung als Modelltier für den Menschen an, da sie ihnen phylogenetisch näher stehen als z.B. Nagetiere oder Schweine. In der reproduktionsbiologischen Forschung haben sich die Weißbüschelaffen aufgrund gleicher Zykluslänge und ähnlicher Hormonprofile im Vergleich mit dem Menschen sowie einer guten Reproduktionsrate als Tiermodell bewährt (FRASER u. LUNN 1999; HEARN 1983).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, anhand dieser Primatenspezies einen Überblick über den geweberemodulierenden und erweichenden Einfluss des Hormons Relaxin auf das Gewebe der Zervix im Hinblick auf die Struktur der Extrazellulären Matrix des Bindegewebes und die Expression kollagenolytischer Enzyme, die Expression von Rezeptoren sowie die Blutgefäßversorgung zu erarbeiten. Hierbei sind folgende Gesichtspunkte von besonderer Bedeutung: 1. ein Vergleich zwischen einer lokal bzw. systemisch hervorgerufenen Relaxinwirkung auf die Zervix und 2. eine Gegenüberstellung der Wirkungen systemisch verabreichten Relaxins und Östradiols sowie eines möglichen Kombinationseffektes beider Hormone auf das zervikale Gewebe des Weißbüschelaffen, um auch eine gegenseitige Beeinflussung der Hormonwirkung zu überprüfen. Dazu soll einerseits rekombinantes humanes Relaxin (rhRLX) lokal an die Zervix appliziert werden, um direkt die erweiternde Wirkung in einem *in vivo*-Versuch zu testen sowie die Auswirkungen auf das Gewebe in bezug auf oben genannte Parameter histologisch, immunhistochemisch und molekularbiologisch zu untersuchen. Andererseits soll der Einfluss systemisch applizierten Relaxins und Östradiols sowie der Kombination aus beiden Hormonen an Organen ovariectomierter Tiere untersucht werden. Durch die Ovariectomie soll das Ovar, der Hauptproduktionsort der beiden untersuchten Hormone, ausgeschaltet werden, um unter kontrollierten Bedingungen arbeiten zu können. Um „Normalwerte“ zum Vergleich der Wirkungen der applizierten Hormone zu erhalten, sollen physiologische Daten an anatomisch und physiologisch intakten, zyklischen Tieren erhoben und ebenfalls für die histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchung des Gewebes genutzt werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Zervix

2.1.1 Anatomie und Histologie

Die Zervix ist anatomisch als Bestandteil des Uterus zu betrachten. Menschen und einige nichtmenschliche Primaten (Anthropoidea) besitzen einen Uterus simplex, der sich aus dem Corpus uteri und der Zervix uteri zusammensetzt (GEISSMANN 2003; KOCH u. BERG 1993). KNÖRR et al. (1989) erwähnen als weiteren Bestandteil den Isthmus uteri, der als unteres Uterussegment den Übergang zwischen Uteruskörper und Zervix als engste Stelle markiert. Bei Feuchtnasenprimaten (Strepsirrhini) und Koboldmakis (Tarsiiformes) (GEISSMANN 2003) sowie Nichtprimaten wie Schwein, Hund, Katze, Nagern u.s.w. liegt im Gegensatz dazu ein Uterus bicornis bestehend aus Zervix, Uteruskörper und den Uterushörnern vor. Die Zervix bildet den Abschluss des Uterus nach außen und trennt ihn somit von der Vagina (MOGHISSI 1999; LEPPERT 1995). Sie wird in ihrem Verlauf vom inneren und äußeren Muttermund (Ostium uteri internum/externum) begrenzt (MOGHISSI 1999; KOCH u. BERG 1993), wobei das Ostium uteri internum den Übergang zum Uterus und das Ostium uteri externum den zur Vagina darstellt. Das Ostium uteri externum befindet sich auf der in das Scheidengewölbe ragenden Zervix-Portio (Portio vaginalis cervicis) (KOCH u. BERG 1993). Die Verbindung zwischen dem inneren und äußeren Muttermund wird vom Zervikalkanal (Canalis cervicis uteri) gebildet (BREEVELD-DWARKASING et al. 2003; KOCH u. BERG 1993; LEONHARDT 1990).

Die Zervix hat eine zylindrische Form (LINDZEY u. KORACH 1999). Im Querschnitt ist ihr Schichtenbau gut zu erkennen. Sie besteht von innen nach außen aus einer Schleimhaut (Tunica mucosa), einer Submukosa (Tela submucosa) und einer Muskelschicht (Tunica muscularis). Nach außen wird das Organ von einer einschichtigen Serosa begrenzt.

Die Schleimhaut ist stark gefaltet (KÜHNEL 1995). Die Zusammensetzung der Mukosa folgt den allgemein gültigen Kriterien des Schleimhautaufbaus (LEONHARDT 1990): die innere Schicht der Schleimhaut und damit die Oberfläche des Zervikalkanals wird vom Schleimhautepithel (Lamina epithelialis mucosae) ausgekleidet. Dieses kann je nach Region als mehrschichtiges, nicht verhornendes Plattenepithel oder als einschichtiges, hochprismatisches Epithel mit Flimmerzellen (KÜHNEL 1995) in Erscheinung treten. An das Epithel schließt sich das Schleimhautbindegewebe (Lamina propria mucosae) an. Diese Schicht kann in der Zervix nicht sichtbar von der anschließenden Submukosa getrennt werden, da hier keine Schleimhautmuskelschicht (Lamina muscularis mucosae) vorhanden ist. Lamina propria und Submukosa bestehen aus lockerem, proliferationsfähigem kollagenen Bindegewebe (LIEBICH 1983).

Das Bindegewebe kann in 3 Bestandteile unterteilt werden: 1) die Bindegewebszellen (Fibroblasten und Fibrozyten), 2) die von den Fibroblasten produzierte Extrazelluläre Matrix bestehend aus der Grundsubstanz (Proteoglykane und Glykoproteine) und aus Fasern (Kollagen und Elastin je nach Gewebe in unterschiedlichen Anteilen) und 3) freie Zellen (Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen etc.) (DEUTZMANN et al. 2003). Der Wassergehalt des Gewebes beträgt durchschnittlich 80% (BREEVELD-DVARKASING et al. 2003; RATH et al. 1994). Er ist bei nicht-schwangeren Frauen mit ca. 77% etwas geringer,

während er bei Frauen zum Zeitpunkt der Geburt bei ca. 83% liegt (JUNG 1984). Hauptanteil der Fasern sind Kollagen Typ I (ca. 70%) und III (ca. 30%) (BREEVELD-DWARKASING et al. 2003; LEPPERT 1995). Dabei ist das Kollagen III v.a. in der Gefäßwand und perivascular sowie als eine Art Beschichtung der Fasern des Kollagen I zu finden (RATH et al. 1994). Es kommen weiterhin Kollagen Typ IV als Bestandteil der Basalmembran sowie v.a. im uterinen Anteil der Zervix Kollagen V und zu geringen Mengen Elastin (0,9-2.4%) vor (IWAHASHI et al. 2003; LEPPERT et al. 1983).

Die Proteoglykane setzen sich aus den Glykosaminoglykanen Dermatan-sulfat, Chondroitin-sulfat, Heparan-sulfat und Hyaluronsäure zusammen (IWAHASHI et al. 2003; JUNQUEIRA et al. 1980). Als Glykoproteine kommen z.B. Fibronektin und Laminin in der Extrazellulären Matrix vor (DEUTZMANN et al. 2003). Das Fibronektin ist an das Kollagen I gebunden und schützt es vor einem Angriff durch kollagenolytische Enzyme (RATH et al. 1994).

In bezug auf das Vorhandensein von Drüsen im Schleimhautbindegewebe der Zervix der Frau sind die Angaben je nach Autor unterschiedlich. Bei MOGHISSI (1999) ist zu lesen, dass keine echten Drüsen, sondern „nur“ Krypten vorkommen, die den Eindruck von Drüsen vermitteln. DALLENBACH-HELLWEG und POULSEN (1990) berichten über das Vorkommen von endozervikalen Drüsen bei der Frau. Ebenso beschreibt LEPPERT (1995) große, verzweigte Drüsen, die allerdings mit einem prismatischen Epithel ausgekleidet sind. Bei KÜHNEL (1995) findet sich eine ausführlichere Beschreibung, die darauf hinweist, dass sich das hochprismatische Epithel in unregelmäßig verzweigte Drüsen fortsetzt, die zyklusabhängig ein muzinhaltiges Sekret absondern.

Die an das Bindegewebe nach außen anschließende Muskelschicht besteht aus einer kräftigeren inneren Ring- und einer schwächeren äußeren Längsmuskelschicht (KOCH u. BERG 1990; LIEBICH 1983). Dazwischen befindet sich eine Gefäßschicht, das Stratum vasculare (KOCH u. BERG 1990). Nach LINDZEY und KORACH (1999) setzen sich die Muskelzellen der Zervix aus dem Myometrium fort. Der Anteil der Muskulatur am Gesamtgewebe der Zervix beträgt nur ca. 10% (JUNG 1984).

An die Muskelschicht schließen sich nach außen die schmale, bindegewebige, gefäß- und nervenführende Tela subserosa sowie abschließend die einschichtige Serosa an (BREEVELD-DWARKASING et al. 2003; LEONHARDT 1990).

Für die Unterteilung der Zervix in verschiedene Abschnitte in Längsrichtung existieren in der Literatur unterschiedliche Angaben. Für den Menschen wird bei LINDZEY und KORACH (1999) sowie MOGHISSI (1999) eine Einteilung in Endo- und Ektozervix vorgenommen. Dabei wird der kaudale Anteil der Zervix, die Portio, als Ektozervix bezeichnet, der restliche kraniale Anteil bis zum Ostium uteri internum als Endozervix. Bei diesem Unterteilungsschema kann man die Grenze zwischen der Ekto- und der Endozervix an der Ausbildung eines unterschiedlichen Epitheltyps erkennen: in der Ektozervix ist i.d.R. mehrschichtiges, nichtverhornendes Plattenepithel vorhanden (DANFORTH 1983; KOCH u. BERG 1990), während die epitheliale Auskleidung der Endozervix aus einschichtig-hochprismatischem Epithel besteht (DALLENBACH-HELLWEG u. POULSEN 1990; MOGHISSI 1990). Die Grenze zwischen diesen beiden Epithelformen wird als Umwandlungs- bzw. Transformationszone (im englischen Sprachgebrauch „squamocolumnar junction“) bezeichnet (BAUMHOER et al. 2003; MOGHISSI 1990; DANFORTH 1983).

2.1.2 Die Funktion der Zervix

Aufgrund ihrer anatomischen Lage spielt die Zervix eine Rolle als uteriner Verschlussapparat (RATH et al. 1994), bzw. als eine Art regulative Barriere zwischen dem intrauterinen und dem äußeren Milieu (MAUL et al. 2002). Funktionell kann man zwischen zwei unterschiedlichen Situationen unterscheiden:

2.1.2.1 Die Aufgaben der Zervix im Zyklus

Die Zervix hat die Aufgabe, im Verlauf des weiblichen Zyklus während des Östrus unter Einfluss der Östrogene Spermien in den Uterus passieren zu lassen. Das Zervixepithel erreicht kurz vor der Ovulation seine größte Höhe und produziert maximale Mengen an Sekret. Dieses Sekret ist wässrig und wenig viskös (MOGHISSI 1999; KOCH u. BERG 1990). Es schützt die Spermien vor Einflüssen der fremden, zervikalen Umgebung sowie vor möglicher Phagozytose und sichert somit ihr Überleben. Der Zervikalschleim ist weiterhin wichtig für den Prozess der Spermienauslese, wodurch abnormale oder unreife Spermien herausgefiltert werden und daher nur intakte Spermien passieren können. Der pH-Wert des Zervikalschleims liegt bei der Frau mit Werten zwischen 7 und 8 im leicht alkalischen Bereich (KNÖRR et al. 1989). Damit stellt er ein adäquates Milieu für die Kapazitation der Spermien dar (MOGHISSI 1999) und bietet zusätzlich einen wirksamen Schutz vor Infektionen (KNÖRR et al. 1989).

Unter dem Einfluss des Progesterons in der auf die Ovulation folgenden Lutealphase wird die Sekretion des Epithels gehemmt. Die Viskosität des Sekretes nimmt zu und die Spermienpassage sowie ein Eindringen von Mikroorganismen werden verhindert (MOGHISSI 1999).

2.1.2.2 Die Aufgaben der Zervix während Gravidität und Geburt

In physiologischen Situationen kommt die Zervix während der Gesamtzeit der Gravidität ihrer Aufgabe als Verschlussapparat nach, indem sie den Konzeptus bis zum Geburtstermin im Uterus zurückhält, um dann zu gegebener Zeit durch ausreichende Öffnung die Austreibung der Frucht zu ermöglichen (LEPPERT 1995; DANFORTH 1983). Somit muss die Zervix also während der Gravidität fest und geschlossen sein, auch um mögliche Infektionen des Konzeptus zu vermeiden. Zum Zeitpunkt der Geburt dagegen muss sie in kürzester Zeit passierbar werden, indem sie erschlafft und sich merklich erweitert (LEPPERT 1995), während der Uterus starke Kontraktionen ausführt (MAUL et al. 2002). Der Verschluss der Zervix während der Gravidität wird durch die Produktion eines festen, zähen Schleims unterstützt, der den so genannten Schleimpfropf bildet (MOGHISSI 1999).

Um diese gegensätzlichen Aufgaben während Gravidität und Geburt zu erfüllen, unterliegt die Zervix einem Wechsel zwischen verschiedenen Formen der Bindegewebegestaltung. Das ist einerseits die geschlossene Form während der frühen und mittleren Gravidität, andererseits die zum Ende der Gravidität ablaufende Phase der langsamen zervikalen Reifung und die zum Zeitpunkt der Geburt notwendige schnelle Aktivierung des Umbaus der Extrazellulären Matrix (WINKLER u. RATH 1999).

2.1.3 Zervikal bedingte Pathologien während Gravidität und Geburt

Aufgrund von pathologischen Situationen (z.B. Polypen oder Myome), posttraumatischen Zuständen, Infektionen (z.B. Mykoplasmen) und/oder Dysmukorrhöen kann eine zervikale Sterilität auftreten (FEIGE et al. 1997).

Durch ihre komplexe Funktion im Rahmen der Geburt kann es auch hier bei fehlerhaften Prozessen zu pathologischen Vorgängen an der Zervix kommen. Findet eine zervikale Reifung zu früh statt spricht man von einer zervikalen Inkompetenz (ELLWOOD 1980) bzw. Zervixinsuffizienz (RATH et al. 1994). Diese führt aufgrund des Versagens der Verschlussfunktion in Verbindung mit einer vorzeitigen Wehentätigkeit oft zu Aborten oder Frühgeburten (KÜNZEL 2003). Im Gegensatz dazu bedingt eine zum eigentlichen Zeitpunkt der Geburt unreife, feste Zervix (Zervixdystokie - KÜNZEL 2003) eine unphysiologische, erschwerte Geburt (LEPPERT 1995; ELLWOOD 1980). Es können beträchtliche geburtshilfliche Probleme auftreten, die zu Totgeburten bzw. einer signifikant erhöhten perinatalen Mortalität und einem vermehrten Auftreten von Erkrankungen auf der fetalen Seite führen (ELLWOOD 1980). Nach RATH et al. (1994) betrifft eine Geburtsterminüberschreitung durch eine unreife Zervix immerhin 10-15% aller Schwangerschaften bei der Frau, wodurch auch die Notwendigkeit einer adäquaten Therapie deutlich wird.

2.1.4 Hormonelle Regulation der Geburt

Die Dauer der Gravidität ist speziesspezifisch unterschiedlich. Beim Menschen beträgt sie ca. 40 Wochen (NATHANIELSZ 1978). Weißbüschelaffen tragen durchschnittlich 144 Tage, andere Primaten wie Rhesusaffen oder Paviane 165 bzw. 185 Tage (HEARN 1983).

Für die Aufrechterhaltung der Gravidität ist bekannterweise das Steroidhormon Progesteron unabkömmlich. Es wird während der frühen Gravidität vom Corpus luteum gebildet. Während der mittleren Phase der Gravidität (Weißbüschelaffe ca. 60. Tag, Mensch ab der 6. Woche, SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 1991; HEARN 1983) übernimmt allmählich die Plazenta die Produktion des Hormons (luteoplazentärer Shift). Progesteron stimuliert die sekretorische Aktivität und Dezidualisierung des Endometriums welches somit die Uterinmilch (Embryotrophe) zur Ernährung des Embryos bereitstellt. Weiterhin hemmt Progesteron die Kontraktilität des Myometriums durch eine Verringerung der Anzahl der Gap junctions zwischen den Myometriumzellen und der Verfügbarkeit intrazellulären Kalziums, welches für die Kontraktionen notwendig ist (RICHTER u. GÖTZE 1993). Außer Progesteron werden von der Plazenta ebenfalls Östrogene, Androgene und Peptidhormone gebildet. Die Produktion von Östrogenen nimmt im letzten Graviditätsdrittel deutlich zu. Beim Menschen und einigen anderen Primaten stammen die für die Östrogensynthese notwendigen androgenen Vorstufen (v.a. Dehydroepiandrosteron) aus der Nebennierenrinde der Mutter und hauptsächlich des Fetus. Aufgrund einer hämochorialen Plazenta bei Nager und Mensch sowie bei anderen Primaten (Haplorhini; siehe Kapitel „Weißbüschelaffe“), besteht ein direkter und inniger Kontakt zwischen maternaler und fetaler Seite (GEISSMANN 2003; ADAMSON et al. 2002; BENIRSCHKE 1999; SCHNORR 1996). Rein maternale Anteile sowie die fetoplazentare Einheit (Plazenta und Fetaler Anteil) sind an der gemeinsamen Steroidhormonsynthese beteiligt, wobei letztere für den Hauptanteil dieser Synthesen verantwortlich ist (MALASSINE u. CRONIER 2002; CARR 1999; YOSHINAGA 1999;

HOFFMANN 1994; SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 1991). Die von der Plazenta gebildeten Peptidhormone gehören meist in die Gruppe der plazentären Gonadotropine. Diese sind z.B. das plazentäre Laktogen (für Wachstum und Differenzierung der Milchdrüse), GnRH, TRH und Somatostatin. Weiterhin wird das Peptidhormon Relaxin von der Plazenta gebildet (RICHTER u. GÖTZE 1993).

Die Signale zur Einleitung der Geburt gehen bei Wiederkäuern wie Rind, Schaf und Ziege nachgewiesenermaßen vom Fetus aus (RICHTER u. GÖTZE 1993; NATHANIELSZ 1978). Hierbei spielt die fetale Hypothalamus-/Hypophysen-Nebennieren-Plazenta-Funktionsachse eine entscheidende Rolle, wodurch die Glukokortikoidproduktion in der fetalen Nebennierenrinde angeregt und Kortisol in den Blutkreislauf freigesetzt wird (RICHTER u. GÖTZE 1993). Diese Reaktion ist noch nicht vollständig geklärt, man vermutet aber, dass z.B. das Nährstoffangebot der Plazenta zu diesem Zeitpunkt nicht mehr ausreicht, was eine Stressantwort (Kortisolfreisetzung) im Fetus hervorruft (RICHTER u. GÖTZE 1993). Das Kortisol wirkt auf die hormonproduzierende Plazenta und hemmt die Progesteronsynthese während die Östrogensynthese gefördert wird. NATHANIELSZ (1978) berichtet, dass bei Wiederkäuern durch Applikation von Glukokortikoiden in den Fetus kurze Zeit später die periphere maternale Progesteronkonzentration abfällt und die Konzentration der Östrogene sowie der Prostaglandine ansteigt. Man kann bei diesen Tieren durch Kortisolgaben die Geburt einleiten (RICHTER u. GÖTZE 1994).

Ein ähnlicher vom Fetus induzierter, geburtsauslösender Mechanismus wird auch für Primaten vermutet. SILBERNAGL und DESPOPOULOS (1991) erwähnen für den Menschen ebenfalls einen Anstieg der hypophysären ACTH-Ausschüttung und damit steigende Glukokortikoid-Konzentrationen im Blutkreislauf, die wie erwähnt zu einer Hemmung der Progesteron- und einer Förderung der Östrogensynthese führen können. Das Kortisol ist aber v.a. für den Fetus selbst wichtig, denn es fördert die Reifung der fetalen Organe, damit ein extrauterines Überleben nach der Geburt möglich ist (JAFJE 1999). Nach NATHANIELSZ (1978) spielt die Induktion einer gesteigerten Produktion von Östrogenen aus fetalen androgenen Vorstufen eine größere Rolle als die Hemmung der Progesteronproduktion durch Kortisol.

Der periphere maternale Progesteronspiegel fällt zum Ende der Gravidität letztendlich ab (RICHTER u. GÖTZE 1993). Desweiteren verringert sich beim Menschen die Zahl der Progesteronrezeptoren im unteren Uterussegment (RATH et al. 1994). Somit lässt die blockierende Wirkung des Progesterons auf die Kontraktilität des Myometriums nach. Gleichzeitig wird durch Östrogene die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Produktion im Endometrium gefördert, wodurch insgesamt die Kontraktionsbereitschaft des Myometriums ansteigt (RICHTER u. GÖTZE 1993; KAPIT et al. 1992). Weiterhin kommt es mit fortschreitendem Wachstum der Frucht zu einer Dehnung der Myometriumzellen. Die Länge der Zellen nimmt etwa um das 10fache zu, bevor die Plastizitätsgrenze erreicht wird. Bei Erreichen dieser Grenze wird im Myometrium eine Reihe von Aktionspotentialen ausgelöst, die nach dem Wegfall der Progesteronhemmung Kontraktionen induzieren. Für diesen Prozess ist auch das Peptidhormon Relaxin von Bedeutung. Es verändert die kollagenen Strukturen des Bindegewebes im Reproduktionstrakt. Es kommt nicht nur zur Auflockerung der Beckenbänder, der Iliosakral- und Schwanzwirbelgelenke, sowie zur Erweichung und Öffnung des Muttermundes, sondern ebenfalls zum Nachgeben der Haltefunktion des Bindegewebes in der Gebärmutter-

muskulatur. Dadurch wird die übermäßige Dehnung der Muskelzellen erst möglich (RICHTER u. GÖTZE 1993).

Durch die Uteruskontraktionen (Wehen) wird die Frucht in den Geburtsweg gepresst. Dabei werden Druckrezeptoren im Bereich des inneren Muttermundes erregt, welche über den Nervus pudendus den Ferguson-Reflex auslösen (LEPPERT 1995; RICHTER u. GÖTZE 1993). Dadurch wird gespeichertes Oxytozin aus dem Hypophysenhinterlappen in Abhängigkeit von der Druckstärke freigegeben (RICHTER u. GÖTZE 1993). Die Anzahl der Oxytozin-Rezeptoren wird im Verlauf der Gravidität unter dem Einfluss von Östrogenen vermehrt (KAPIT et al. 1992). Oxytozin induziert die Bauchpresse (Entleerungsreflex) und Schubkontraktionen des Uterus. Durch diese Kontraktionen wird der Uterus gleichzeitig mit dem Austrieb der Frucht verkleinert, wodurch er mit der Frucht auch in den Wehenpausen in Kontakt bleibt und ein Zurücksinken der Frucht in den Bauchraum verhindert wird. Nach Austreibung der Frucht fällt der Reiz für die Druckrezeptoren weg. Trotzdem ermöglichen weiterhin stattfindende Verkleinerungskontraktionen des Uterus die Austreibung der Fruchthüllen und der Plazenta (RICHTER u. GÖTZE 1993).

2.1.5 Veränderungen in der Extrazellulären Matrix

Bei den oben beschriebenen Prozessen während der Geburt wird die Zervix durch den hindurchtretenden Fetus auf ein Vielfaches ihrer eigentlichen Größe passiv gedehnt. So ist sie z.B. beim Menschen außerhalb der Geburt im geschlossenen Zustand 2-3 cm lang (MOGHISSI 1999; LEPPERT 1995; DANFORTH 1983) und hat einen Querschnitt von ca. 2,5 bis 3 cm (DANFORTH 1983). Das Lumen des Kanals ist 0,5 bis 1 cm weit. Während der Geburt erreicht die Zervix eine maximale Weite von ca. 10 cm im Innendurchmesser, die nötig ist, um den Kopf der Frucht passieren zu lassen (LEPPERT 1995). Durch den langsam hindurchtretenden Fetus wird die Zervix allmählich passiv gedehnt und verliert dabei ihre ursprüngliche Form. Zusätzlich verursachen die Kontraktionen des Myometriums, dessen Muskelfasern mit denen der Zervix in Verbindung stehen, Zugkräfte, die auf die Zervix wirken und den Gebärmutterhals während der Uteruskontraktion mit auseinanderziehen. Der sichtbar vom Uterus abgesetzte Gebärmutterhals wird kürzer. Gleichzeitig nimmt dessen Wandstärke ab, bis die Zervix schließlich völlig verstreicht und nicht mehr vom Uterus zu unterscheiden ist (siehe Abb. 2.1) (JUNG 1984; DANFORTH 1983).

Um diese extremen und in bezug auf Gravidität und Geburt gegensätzlichen Vorgänge zu ermöglichen, sind komplexe Mechanismen der Geweberemodulierung notwendig. Diese beziehen sich grundsätzlich auf alle Bestandteile der Extrazellulären Matrix.

Während der **Gravidität** sichert eine gesteigerte Kollagen-, Protein-, Glykosaminoglykan- und Fibronektinsynthese den Verschluss der Zervix. Es kommt zu einer Zunahme des Volumens der Zervix gegenüber nichtgraviden Organen (RATH et al. 1994). Die Kollagenfasern sind dicht und gerichtet in Bündeln angeordnet (ELLWOOD 1980).

Im Verlauf der **Zervixreifung** (beim Menschen ab der 36. Graviditätswoche) kommt es zu einer Verminderung der Kollagenproduktion, verbunden mit einer Abnahme der Affinität des Fibronektins zu Kollagen und einer Destabilisierung deren Zweierbeziehung sowie zur Dissoziation von beiden Molekülen. Dadurch werden Angriffspunkte für Kollagenasen

geschaffen (RATH et al. 1994). Prostaglandine, v.a. PGE spielen eine Rolle im Prozess der zervikalen Reifung und sorgen für eine erhöhte Dehnbarkeit des Organs durch Stimulation der Kollagenaseproduktion in vorhandenen Zellen, wie z.B. Makrophagen (ELLWOOD 1980). Im Vergleich mit dem ersten Graviditätsdrittel kommt es am Ende der Gravidität zu einer lichtmikroskopisch sichtbaren eher diffusen und dissoziierten Anordnung des Kollagens (IWAHASHI et al. 2003).

Weiterhin ist ein Anstieg des Gesamt-Glykosaminoglykangehaltes zu verzeichnen. Dabei sind ein moderater Abfall der Dermatan-sulfatkonzentration, ein Anstieg des Hyaluronsäuregehaltes und eine Verminderung des Fibronektin-gehaltes zu sehen. Der Verlust an Kollagenen und sulfatierten Glykosaminoglykanen führt zu einer erhöhten Dehnbarkeit des Gewebes, während der erhöhte Hyaluronsäureanteil zu einer Hydratation bzw. Ödematisierung und damit Erweichung des Gewebes der nunmehr reifen Zervix führt (IWAHASHI et al. 2003). Hyaluronat stimuliert außerdem die Interleukin-1-(IL1)-Synthese in Fibrozyten und Granulozyten. Interleukine wirken wiederum chemotaktisch auf weitere Leukozyten, die Kollagenasen u.ä. freisetzen können (WINKLER u. RATH 1999; RATH et al. 1994).

Die Zervixreifung beinhaltet neben Wasserretention und Kollagenabbau auch eine verstärkte Vaskularisierung des Gewebes. Zusätzlich kommt es zu einer Hypertrophie und Hyperplasie des sezernierenden endozervikalen Epithels (MOGHISSI 1999; LEPPERT 1995).

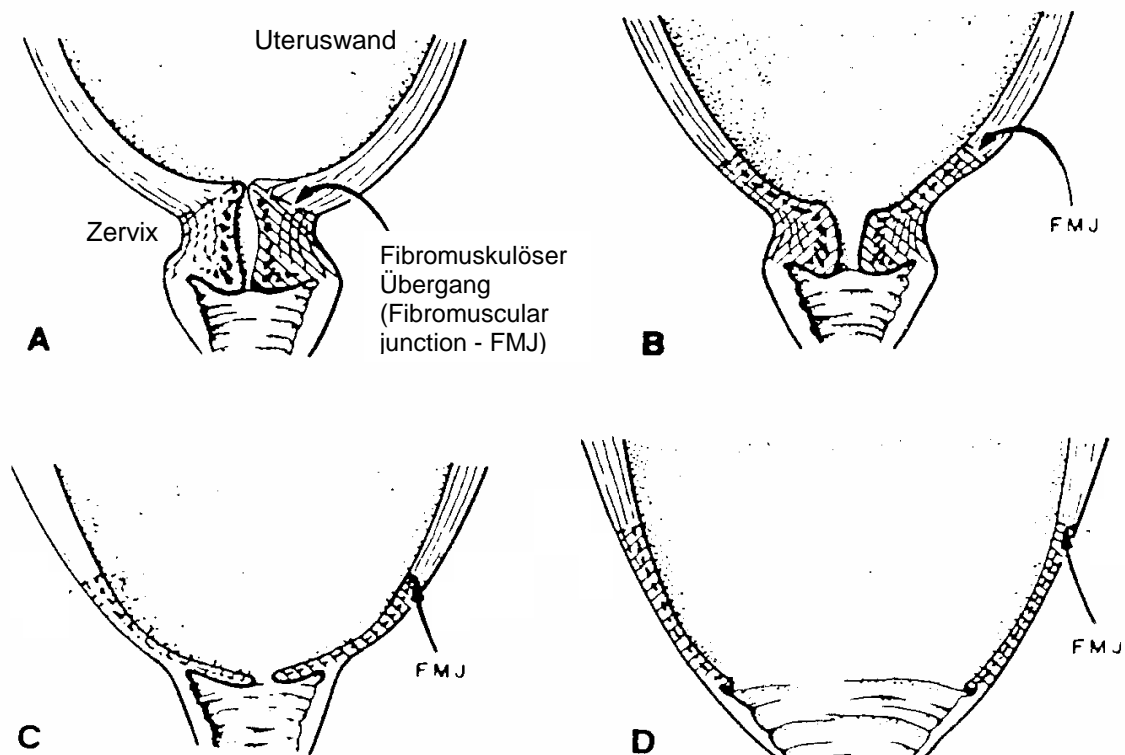


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Öffnung der Zervix. Der fibromuskuläre Übergang (FMJ) soll die Grenze zwischen Uterus und Zervix kennzeichnen. **A:** geschlossene, deutlich vom Uterus abgesetzte Zervix; **B:** beginnende Öffnung der Zervix von innen nach außen, Abnahme der Wandstärke und Verkürzung des Gebärmutterhalses; **C:** die Zervix ist völlig verstrichen; **D:** vollständige Öffnung der Zervix. (DANFORTH 1983)

Unter der **Geburt** kommt es zu massiven Veränderungen im Bindegewebe der Zervix, die sowohl die Extrazelluläre Matrix mit den kollagenen Fasern und der Grundsubstanz als auch die Zusammensetzung der Zellen in dieser Gewebeschicht betreffen.

Das Erscheinungsbild des **Kollagenfasernetzwerkes** verändert sich intra partum im Gegensatz zur nichtgraviden und graviden Zervix: elektronenmikroskopisch sind dünne und verstreute Fasern zu sehen, die irregulär fragmentiert bzw. zerrissen erscheinen (ELLWOOD 1980). Das Bindegewebe zeigt ein inhomogenes Bild mit amorphem Material zwischen den Fasern, welches eventuell durch Aggregation von depolymerisierten Fasern entsteht. Die Kollagenfaserbündel werden also aufgelöst, was elektronenmikroskopisch auch am Sichtbarwerden von einzelnen Mikrofibrillen erkennbar ist (JUNQUEIRA et al. 1980). In der intrapartalen Zervix geht im Vergleich zur nichtgraviden Zervix der Gesamt-Kollagengehalt deutlich zurück (nichtgravid=100% versus intrapartum=8,3%) (JUNQUEIRA et al. 1980). Der Gehalt an löslichen Kollagenen nimmt im Verhältnis zu den nichtlöslichen Kollagenen zu. Grund dafür kann einerseits ein vermehrter Kollagenabbau, andererseits eine Synthese weniger vernetzter Kollagenfasern sein (ELLWOOD 1980).

Das Verhältnis von Kollagen Typ I und III verändert sich nach ELLWOOD (1980) unter der Geburt nicht. IWAHASHI et al. (2003) beschreiben, dass es im letzten Graviditätsdrittel bis zur Geburt zu einem Abfall der Kollagen I-Konzentration bei gleichzeitigem relativen Anstieg des Kollagen III-Anteils kommt. Der relative Anstieg des Kollagen III kann zu veränderten Eigenschaften und somit zur Erweichung des Gewebes führen. Die Verringerung der Kollagenkonzentration an sich wird durch einen Anstieg der Aktivität von Kollagenasen während der Gravidität hervorgerufen (MOGHISSI 1999). Eine indirekte Stimulation der Kollagenolysemechanismen, z.B. über eine Aktivierung der Prostaglandinsynthese, kann vermutlich durch den Einfluss von Östrogenen hervorgerufen werden (ELLWOOD 1980).

Der Gehalt und die Zusammensetzung der Glykosaminoglykane der **Grundsubstanz** zeigen nach JUNQUEIRA et al. (1980) keine großen Veränderungen. Es ist lediglich ein moderater Anstieg des Chondroitinsulfatanteils und ein Abfall der Dermatansulfatkonzentration zu verzeichnen. Aufgrund dessen geht der Autor von einer größeren Bedeutung der Kollagenolyse-Mechanismen für die erweichenden Prozesse aus. ELLWOOD (1980) berichtet über einen Anstieg des Hyaluronsäure- sowie des Keratansulfatgehaltes bei gleichzeitigem Abfall der Konzentrationen von Chondroitin- und Dermatansulfat zum Zeitpunkt der Geburt. Da Hyaluronsäure in hochhydratisierter Form auftritt, führt ein erhöhter Gehalt an dieser Grundsubstanzkomponente zu dem erwähnten erhöhten Wassergehalt. RATH et al. (1994) haben in ihren Untersuchungen in bezug auf die Grundsubstanz ebenfalls einen drastischen Abfall der Dermatansulfatkonzentration sowie einen extremen Anstieg des Hyaluronsäure-gehaltes mit Beginn der Geburt festgestellt.

Das Verhältnis der im Bindegewebe vorkommenden **Zellen** verschiebt sich zum Zeitpunkt der Geburt ebenfalls. Während bei Services nichtgravider Individuen die Bindegewebszellen (Fibroblasten bzw. Fibrozyten) vorherrschen, sind in der Zervix intrapartum vermehrt freie Zellen wie Mastzellen, Makrophagen und v.a. neutrophile und eosinophile Granulozyten im Stroma zu sehen (RATH et al. 1994). Es ergibt sich ein der Zervicitis ähnliches Bild (JUNQUEIRA et al. 1980). Die Entwicklung der Entzündungsreaktion wird durch den Progesteronabfall kurz vor der Geburt initiiert (MAUL 2002). Aufgrund der Einwirkung von Interleukinen (IL-1 α + β /IL-8) treten Granulozyten aus den Blutgefäßen in das Bindegewebe über und setzen dort den Inhalt ihrer Granula frei (MACKLER 1999; WINKLER u. RATH

1999; JUNQUEIRA 1980). Nach WINKLER und RATH (1999) ist im Gewebe ebenfalls ein Anstieg der IL-6-Produktion zu sehen. IL-6 stimuliert die Prostaglandin- und Leukotrien-synthese. Diese Substanzen bewirken eine Dilatation der Blutgefäße, die die Extravasation der Leukozyten fördert. Prostaglandine und Zytokine sorgen weiterhin für eine verstärkte und anhaltende Chemotaxis, die die Einwanderung neuer Zellen ermöglicht.

Die Granula der jeweiligen Zellen enthalten Kollagenasen und andere Proteinasen (RATH et al. 1994), die als Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) bezeichnet werden (MAUL et al. 2002). Diese Enzyme sind verantwortlich für den Abbau von Kollagenen, v.a. der Kollagene I, II und III sowie IV (WOESSNER u. NAGASE 2000) (näheres zu MMPs siehe Kapitel 2.1.6 „Überblick über die Matrix-Metalloproteinasen“). Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Anzahl von immigrierten Granulozyten und dem Ausmaß der Kollagenolyse. Diese wird durch einen faserfreien Hof, der sich in unmittelbarer Umgebung der Zellen bildet, lichtmikroskopisch sichtbar (JUNQUEIRA et al. 1980).

Zellen, wie basophile oder neutrophile Granulozyten, Monocyten und Makrophagen, aber auch Epithelzellen und Fibroblasten können offenbar unter Regulation durch Steroidhormone einen weiteren Faktor produzieren, den Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) (MAUL et al. 2002). PAF ist bekannt für die Stimulation der MMP-1-Produktion *in vitro* (SUGANO et al. 2000). Er fördert die Freisetzung der Prostaglandine E1 und E2 aus eosinophilen Granulozyten (KULIKOV u. MUZYA 1998). Östrogene bewirken eine verminderte Aktivität der PAF-Acetylhydrolase (PAF-AH), die PAF inaktiviert und sorgen damit für eine erhöhte Aktivität des PAF. Progesteron und Dexamethason steigern die Produktion der PAF-AH und vermindern somit die Aktivität des PAF (YASUDA u. JOHNSTON 1992). MAUL et al. (2002) konnten durch lokale PAF-Behandlung einen Anstieg der stromalen Infiltration mit polymorphkernigen Leukozyten feststellen sowie eine Abnahme der Festigkeit der Zervix und eine Verringerung des Gehaltes an quervernetztem Kollagen erzeugen.

Die während der Geburt ablaufenden geweberemodulierenden und v.a. kollagenolytischen, durch MMPs hervorgerufenen Prozesse würden auf Dauer zu einer tiefgreifenden Gewebeerstörung führen. Deshalb ist dieser Vorgang zeitlich eng limitiert und wird nach Abschluss der Geburt durch eine vermehrte Ausschüttung von Kollagenaseinhibitoren (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases - TIMPs) gestoppt (RATH et al. 1994; WINKLER u. RATH 1999). Durch gesteigerte Synthese der Bindegewebskomponenten kommt es zu einer Neuformierung der Zervix, bis der normale nichtgravide Zustand annähernd wiederhergestellt ist (RATH et al. 1994). Die Dauer der Rückbildung der Reproduktionsorgane nach der Geburt ist speziesspezifisch unterschiedlich und sehr variabel: beim Pferd dauert sie ca. 14 Tage, beim Rind ca. 42 Tage, beim Hund 4-5 Wochen und bei der Ziege rund 6 Wochen (RICHTER u. GÖTZE 1993). SEHDEV (1999) gibt für die Rückbildung und Wiederherstellung des Reproduktionstraktes bei der Frau einen Zeitraum von ebenfalls 6 Wochen an.

2.1.6 Überblick über die Matrix-Metalloproteinasen

Nach WOESSNER und NAGASE (2000) gibt es mehr als 200 Metalloproteinasen, die ein Zinkatom im aktiven Zentrum des Enzyms enthalten. Diese Metalloproteinasen werden in 8 Stämme mit insgesamt 40 Familien und weiteren Subfamilien eingeteilt. Die Zuordnung zu den Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) ist nicht einfach. Es existieren jedoch 2 Kriterien, die auf alle MMPs zutreffen und für weitere Zuordnungen angewendet werden sollten: die Hemmung der Funktion dieser Enzyme durch ihre Inhibitoren (TIMPs) und die Sequenz-Ähnlichkeit des jeweiligen Enzyms mit der Kollagenase, ausgehend von einer evolutionären Beziehung.

Die Matrix-Metalloproteinasen werden nummeriert und mit „MMP“ sowie der entsprechenden Ziffer bezeichnet, z.B. MMP-1, MMP-2 usw. Bisher sind rund 20 MMPs bekannt. Es existiert jedoch für jedes Enzym noch mindestens eine weitere Bezeichnung, die in der Regel Auskunft gibt über dessen Funktion wie z.B. Kollagenase oder Gelatinase.

Eine typische MMP ist aus einem Signalpeptid, einem Propeptid, einer katalytischen und einer Hemopexin-Domäne aufgebaut. Die Enzyme sind im Gewebe oder in Kultur meist in der latenten Proenzym-Form zu finden. In den synthetisierenden Zellen werden in der Regel die Enzymvorstufen der MMPs produziert, welche nach Freisetzung extrazellulär aktiviert werden (WOESSNER u. NAGASE 2000).

Im Folgenden sollen die wichtigsten MMPs für den Abbau der in der Zervix vorherrschenden Kollagene aufgeführt werden.

Das erste Enzym in der Gruppe der MMPs ist die MMP-1. Sie wird auch als Kollagenase-1, Fibroblasten-Kollagenase oder interstitielle Kollagenase bezeichnet. Die MMP-1 baut hauptsächlich die interstitiellen Kollagene Typ I, II und III ab, indem sie die Moleküle in ein $\frac{3}{4}$ -langes Stück vom N-terminalen und ein $\frac{1}{4}$ -langes Stück vom C-terminalen Ende her zerteilt. Die MMP-1 ist im Zahnfleisch, in der Haut, im Knochen und in rheumatoider Synovia des Menschen nachgewiesen worden (WOESSNER u. NAGASE 2000).

Die MMP-2 wird auch als Gelatinase A, 72-kDa-Gelatinase oder Typ-IV-Kollagenase bezeichnet. Sie kann das Kollagen IV der Basalmembran abbauen, ist allerdings nicht spezifisch für den Abbau der interstitiellen Kollagene I, II oder III. Diese MMP wurde aus Tumor- bzw. Knochengewebe von Nagern sowie aus menschlicher Haut und Zahnfleisch isoliert (WOESSNER u. NAGASE 2000). STYGAR et al. (2002) haben v.a. zervikale stromale Fibroblasten, aber auch glatte Muskelzellen als Quellen für die MMP-2 identifiziert.

Die MMP-8 ist eine aus polymorphkernigen Leukozyten und eventuell anderen Zellen stammende Kollagenase. Sie wird als Kollagenase-2 oder Neutrophilen-Kollagenase bezeichnet, um sie von der interstitiellen Kollagenase (MMP-1) zu unterscheiden. Die MMP-8 ist in den zytoplasmatischen Granula der synthetisierenden Zellen lokalisiert und wird bei phagozytotischen Prozessen freigesetzt (WOESSNER u. NAGASE 2000). Sie baut wie die MMP-1 die interstitiellen Kollagene Typ I, II und III ab (SENNSTRÖM et al. 2003).

Die MMP-9 oder auch Gelatinase B bzw. 92-kDa-Gelatinase, entstammt wie die MMP-8 den Granula der polymorphkernigen Leukozyten und Makrophagen. Welche Proteine genau die MMP-9 abbaut, ist nicht ganz klar. Offenbar kann das Enzym z.B. Kollagen Typ III und V abbauen (WOESSNER u. NAGASE 2000). STYGAR et al. (2002) vermuten, dass die MMP-9 den Austritt von Zellen aus den Blutgefäßen durch den Abbau des Kollagen IV der Basalmembran fördert.

Die MMP-12 wird auch als Makrophagen- oder Metallo-Elastase bezeichnet. Sie wird wie ihr Name vermuten lässt, in Makrophagen gebildet und kann Elastin sowie Kollagen IV abbauen. Elastin kann weiterhin z.B. durch MMP-2 und MMP-9 abgebaut werden.

MMPs-14 bis -17 sind die sogenannten Membran-Type-MMPs 1 bis 4. Sie besitzen Transmembrandomänen und bauen v.a. die interstitiellen Kollagene (Typ I, II und III) ab (WOESSNER u. NAGASE 2000).

Glykoproteine wie Fibronectin und Laminin können ebenfalls Ziel der MMP-Aktivität sein. Fibronectin kann von MMP-1, -3, -7, 10, -12 bis -15 und evtl. MMP-2 gespalten und abgebaut werden. Laminin wird durch MMP-3, -7, -12 und -14 sowie evtl. MMP-2 und -9 abgebaut (WOESSNER u. NAGASE 2000).

2.1.7 MMPs im Reproduktionstrakt

Im **Ovar** werden die MMP-2 und -9 in den Thekazellen und im Interstitium sowie erstere zusätzlich in den Granulosazellen produziert. Mit der Follikelreifung nimmt die kollagenolytische und gelatinolytische Aktivität zu. Eine ausgewogene Regulation von MMPs und TIMPs führt zur Ausbildung einer proteolytischen Homöostase in der Extrazellulären Matrix des Ovars. Das MMP-System ist wichtig für die Regulation der normalen Follikelreifung und –atresie. Der Follikel ist im Stroma des Ovars von Kollagen, Laminin und Fibronectin umgeben. Durch einen Anstieg von MMPs (MMP-1, -2, -9, -13 und -19) kommt es zu einer Schwächung des apikalen follikulären Bindegewebes durch Auflösung der Granulosazell-Basalmembran und Fragmentierung der Kollagene. Dieser Vorgang ermöglicht hier die für den Eisprung notwendige Ruptur. Auch im Corpus luteum sind eine zelluläre Reorganisation und Neovaskularisierung nötig. Strukturelle Veränderungen werden durch Mechanismen wie Proteolyse und Phagozytose hervorgerufen. Die Anzahl der Makrophagen steigt während der Rückbildung des Gelbkörpers an. Sie phagozytieren Lutealzellen und setzen wie schon erwähnt MMPs frei, die den Vorgang des Gewebeumbaus unterstützen (CURRY u. OSTEEN 2001).

MMPs spielen weiterhin eine wichtige Rolle bei der Degradation der Basalmembran und der Extrazellulären Matrix des **Uterus** im Rahmen von invasiven Prozessen, die nötig sind, um eine Gravidität zu ermöglichen. Während der Implantation und Plazentation findet eine Invasion von Trophoblastzellen in das Endometrium statt. Dies ist möglich durch eine dramatische, zelluläre Mobilität, eine Umgestaltung des mütterlichen Gewebes und die Plazenta-Entwicklung. Hier spielen beim Menschen und anderen Primaten wiederum MMPs (MMP-1, -2, -3, -9, -11 und -14) sowie TIMPs (TIMP-1 und -3) eine Rolle. Die MMPs werden von den Trophoblastzellen sezerniert (CURRY u. OSTEEN 2001; QIN et al. 1997a). Eine durch Progesteron hervorgerufene Hemmung der MMP-Aktivität während der Gravidität ist möglicherweise wichtig für die Stabilität des Gewebes und den dauerhaften maternal-fetalen Kontakt. Dafür ist auch im Uterus eine Balance zwischen der Aktivität der MMPs und deren Inhibitoren (TIMPs) notwendig. An der Implantationsstelle selbst ist ein Verlust von Progesteronrezeptoren zu finden, der die hemmende Wirkung dieses Hormons lokal einschränkt und damit eine fokale kollagenolytische Aktivität für eine erfolgreiche Implantation ermöglicht (CURRY u. OSTEEN 2001).

In den Epithelzellen der **Zervix** sind die MMP-1 und MMP-2 nachgewiesen worden, wobei v.a. für die MMP-2 ein invasives Potential bei malignen Entartungen festgestellt werden konnte (BRUMMER et al. 2001).

2.2 Hormone

Zum Zeitpunkt der Geburt spielen unter anderem die Hormone Östradiol und Relaxin eine wichtige Rolle in bezug auf die Regulation der Zervixfunktion. Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen beziehen sich auf die Wirkung dieser beiden Hormone allein und in Kombination auf das zervikale Gewebe. Im Folgenden sollen deshalb schwerpunktmäßig v.a. diese Hormone beschrieben und ihre Struktur, Synthese, Wirkungsweise und Wirkungen erläutert werden. Da während des weiblichen Zyklus sowie in der Gravidität und zum Zeitpunkt der Geburt auch dem Progesteron eine wichtige, v.a. zum Östradiol gegenteilige Funktion zukommt, soll im Folgenden auch kurz auf dieses Hormon eingegangen werden.

2.2.1 Östradiol

2.2.1.1 Hormongruppe, Struktur und Synthese

Östradiol ist ein bekanntes Steroidhormon mit 18 Kohlenstoff-Atomen (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 1991). Das Grundgerüst besteht aus einem in Abbildung 2.2 dargestellten Perhydrozyklopentanophenanthren-Gerüst mit drei 6er- Ringen (Ring A, B, C) und einem 5er-Ring (Ring D), wobei der erste 6er-Ring aromatisiert ist (PETRIDES 2003).

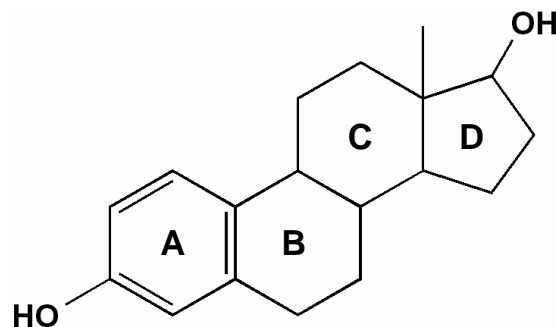


Abb. 2.2 : Darstellung der Struktur des Östradiols mit 18 C-Atomen. Die drei 6er-Ringe sind mit A, B sowie C und der 5er-Ring mit D gekennzeichnet.
(Quelle: www.uni-saarland.de/.../struktur/oestradiol.gif)

Östradiol (E2) ist neben Östron (E1) und Östriol (E3) das wichtigste und potenteste Hormon aus der Gruppe der Östrogene.

Die Synthese des Östradiols ist v.a. in den Granulosa- und Thekazellen im Follikel des Ovars sowie in der Plazenta, aber auch in der Nebennierenrinde und den Leydigischen Zwischenzellen des Hodens lokalisiert (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 1991).

Die Biosynthese der Steroidhormone geht vom Pregnenolon aus, welches aus Cholesterin gebildet wird und läuft in den synthetisierenden Organen nach dem gleichen Grundprinzip ab.

In den Granulosazellen des menschlichen Ovars entsteht als erstes aus Pregnenolon Progesteron durch 17 β -Hydroxylierung. Das Progesteron wandert aus den Granulosa- in die Theka-interna-Zellen, wo es in Androstendion umgewandelt wird. Das gebildete Androstendion diffundiert wieder in die Granulosazellen. Hier kann es einerseits durch die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 β HSD) in Testosteron und weiter durch die Aromatase in Östradiol umgewandelt werden. Andererseits kann aus Androstendion durch Aromatase Östron und aus diesem durch 17 β HSD Östradiol entstehen (PETRIDES 2003; SMITH 1999).

Für die Regulation der Östrogen-Synthese sind die Gonadotropine FSH und LH von Bedeutung. FSH ist im Ovar wichtig für die Rekrutierung, Auswahl und Reifung der Follikel und letztendlich für die Ovulation. Es regt die Proliferation der Granulosazellen an und führt weiterhin zur Induktion des Aromatase-Komplexes, wodurch die Zelle die Fähigkeit zur Östrogensynthese erhält. Unter dem Einfluss der gebildeten Östrogene kommt es zu einer kontinuierlichen Zunahme der LH-Rezeptoren an der Zelloberfläche und zur Induktion einer verstärkten Progesteronsynthese.

Bis zum 9.Tag der Follikelphase hat sich im Ovar ein feines Kapillarnetz ausgebildet, durch welches die gebildeten Östrogene in den Blutkreislauf gelangen. Sie können dadurch die Zielorgane erreichen und in den Hypothalamus/die Hypophyse gelangen, um die Hormonsekretion des Ovars durch Rückkopplung zu regulieren.

Der Transport im Blut erfolgt fast ausschließlich über das Testosteron-Östrogen-bindende Protein (PETRIDES 2003).

Während der Gravidität findet eine Verlagerung der Östrogensynthese vom Corpus luteum (C.l.) zur Plazenta statt. Die Hormonproduktion während der mittleren und späten Gravidität ist in mehreren Kompartimenten lokalisiert: einem maternalen Anteil, der Plazenta an sich und einem fetalen Anteil, wobei letztere beiden zusammen die fetoplazentare Einheit bilden. In der Plazenta selbst sind nicht alle an der Steroidhormonsynthese beteiligten Enzyme vorhanden, weshalb die Kooperation zwischen den Kompartimenten notwendig ist. Für die Steroidhormonsynthese gibt es verschiedene Möglichkeiten. Um Östradiol zu produzieren, wird z.B. Cholesterin auf der maternalen Seite in Pregnenolon umgewandelt, was durch die Plazenta zur fetalen Seite transportiert wird. Dort findet dann die Umwandlung in Dehydroepiandrosteron statt, welches in die Plazenta gelangt und dort über Androstendion in Östradiol umgewandelt werden kann (YOSHINAGA 1999).

2.2.1.2 Wirkungsmechanismus und Wirkungen

Die Wirkungen der Östrogene werden durch die Bindung an spezifische Rezeptoren vermittelt. Man unterscheidet Rezeptoren mit genomischer und nicht genomischer Wirkung. Um eine genomische Wirkung hervorrufen zu können, erfolgt eine Bindung der Hormonmoleküle an kernständige Rezeptoren (SCOBIE et al. 2002). Bisher sind 2 Subtypen des Östradiolrezeptors (ER) bekannt: ER α und ER β (GAO et al. 2003; WANG et al. 2001). Östradiol kann aufgrund seiner Lipophilie passiv die Zellmembran passieren und an den intrazellulären Rezeptor binden. Durch die Ligandenbindung erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptormoleküls, die die Bindung an die DNA an sogenannten „Estrogen-response-elements“ ermöglicht (BEATO u. KLUG 2000; LINDZEY u. KORACH 1999). Die Wirkung des Hormons wird letztendlich durch die Transkription verschiedener Gene hervorgerufen.

Es existieren nach neueren Erkenntnissen aber auch membranständige, nicht genomische Östradiolrezeptoren, die eine schnellere biologische Antwort ermöglichen (LINDZEY u. KORACH 1999). Diese Rezeptoren sind nach GAO et al. (2003) vermutlich membran-assoziierte Bindungsstellen für das Sexualhormon-bindende Protein, welches hier die östrogene Wirkung vermittelt.

Nach BEATO und KLUG (2000) können Steroidhormone weiterhin in intrazelluläre Signaltransduktionswege eingreifen, die eigentlich für die intrazelluläre Weiterleitung von Signalen durch Bindung anderer Liganden an membranständige Rezeptoren genutzt werden.

Wie die Möglichkeiten der Signalübertragung sind auch die Wirkungen der Östrogene im Zielgewebe vielfältig. Sie fördern die Ausprägung und Aufrechterhaltung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale und entfalten ihre Wirkungen v.a. am weiblichen Reproduktionstrakt (PETRIDES 2003).

Hier fördert Östradiol am **Ovar** die Follikel- und Eireifung (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 1991). Die Menge des in den Follikeln produzierten Hormons erreicht ein Maximum kurz vor der Ovulation. Dieser E2-Anstieg bewirkt durch positive Rückkopplung einen drastischen Anstieg der LH-Freisetzung aus der Hypophyse. Dieser wiederum führt zur Ovulation des reifen Follikels (LINDZEY u. KORACH 1999). Die Ovulation ist ein dynamischer, irreversibler Vorgang. Hervorgerufen durch den drastischen LH-Anstieg kommt ein Mechanismus der Initiation und Synchronisation biochemischer Abläufe wie Synthese und Sekretion von Prostaglandinen, Progesteron, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und proteolytischen Enzymen in Gang. Wie im Kapitel 2.1.7 „MMPs im Reproduktionstrakt“ beschrieben, bewirkt ein Anstieg der ovariellen proteolytischen Enzyme (MMPs) eine Schwächung der apikalen Follikelwand, welche deren Ruptur ermöglicht und somit den Eisprung unterstützt (WANG et al. 2001).

Das Oberflächenepithel des **Ovidukts** wird durch steigende E2-Konzentrationen in eine Phase vermehrter Zellteilung überführt. Es sind eine Hypertrophie und vermehrte Zilienbildung des Epithels zu sehen (LINDZEY u. KORACH 1999).

Im **Uterus** bewirkt Östradiol den Übergang des Endometriums in die Proliferationsphase (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 1991) und bereitet den Uterus auf die anschließende Gestagenwirkung vor (PETRIDES 2003). Die Expression der Progesteronrezeptoren wird unter Östrogeneinfluss erhöht. Es kommt – vermutlich vermittelt durch Wachstumsfaktoren –

zum Aufbau der Uterusschleimhaut, zu einer Verlängerung der Drüsen, zum Wachstum und zur Vermehrung der Myometriumzellen, zur Ödematisierung des Stromas und zu einer vermehrten Vaskularisierung des uterinen Gewebes (PETRIDES 2003; LINDZEY u. KORACH 1999). Letztere wird durch eine östrogeninduzierte Stimulation des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) hervorgerufen. Dieser Faktor, der auch als vaskulärer Permeabilitätsfaktor bezeichnet wird, fördert also einerseits die Vaskularisierung durch Proliferation der uterinen Blutgefäße und andererseits die Erhöhung ihrer Permeabilität (CULLINAN-BROVE u. KOOS 1993). Auch die Zahl der Östradiolrezeptoren wird zuerst in den Stromazellen, dann im Endometrium erhöht (LINDZEY u. KORACH 1999).

Die zum Zeitpunkt der Geburt hin ansteigende Östrogenkonzentration verstärkt die Kontraktionen der Uterusmuskulatur (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 1991). Östradiol fördert die Empfindlichkeit des Myometriums gegenüber Oxytozin und $\text{PGF}_{2\alpha}$ durch Induktion der Expression der entsprechenden Rezeptoren und stimuliert die Bildung von Gap junctions. Während der Gravidität wird dieser Einfluss durch Progesteron gehemmt (LINDZEY u. KORACH 1999).

In der **Zervix** verändert sich unter dem Einfluss des Östradiols die Konsistenz des Schleimpfropfes. Die Synthese des Zervikalschleims erreicht ihren Höhepunkt in der präovulatorischen Phase bei maximalen E2-Spiegeln. Das fördert, wie in Kapitel „Funktion der Zervix“ beschrieben, die Wanderung und das Überleben sowie die Kapazitation der Spermien (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 1991). Das Gewebe der Zervix wird vermehrt vaskularisiert und ödematisiert. E2 spielt eine Rolle bei der zervikalen Reifung und Erweichung indem es wie im Kapitel 2.1.5 „Veränderungen in der Extrazellulären Matrix“ beschrieben, die Kollagenkonzentration erniedrigt. Es fördert den Abbau von Kollagen Typ I, ein Effekt der durch Progesteron vollständig gehemmt wird (RAJABI et al. 1991). Weiterhin steigert E2 die Sensitivität der zervikalen Zellen gegenüber Relaxin (LINDZEY u. KORACH 1999; HUANG et al. 1993).

In der **Vagina** sind unter Östradioleinfluss eine Verdickung der Schleimhaut sowie eine vermehrte Abstoßung der Epithelzellen zu sehen. Diese Zellen sind glykogenhaltig. Glykogen führt zu einer gesteigerten Milchsäureproduktion durch die Bakterien der normalen Vaginalflora. Dadurch sinkt der pH-Wert zu diesem Zeitpunkt deutlich ab, was die Gefahr einer Infektion verringert (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 1991).

2.2.2 Progesteron

2.2.2.1 Struktur, Synthese und Wirkungen

Progesteron ist ebenso wie Östradiol ein Steroidhormon. Es besteht aus dem für diese Hormongruppe typischen Perhydrozyklopentanophenanthren-Gerüst bzw. dem unter Punkt 2.2.1.1 beschriebenen Ringsystem, das sich beim Progesteron aus 21 C-Atomen zusammensetzt (Abb. 2.3).

Die Biosynthese des Progesterons geht wie die des Östradiols vom Pregnenolon aus. Progesteron entsteht aus diesem durch 17β -Hydroxylierung in den Granulosazellen des Ovars (PETRIDES 2003).

Die Gonadotropine FSH und LH regulieren auch die Synthese und Wirksamkeit des Progesterons. FSH fördert z.B. die Ausbildung von LH- und Steroidhormon-Rezeptoren an

den Zellen des Follikels. Damit wird einerseits die Synthese des Progesterons, die durch LH stimuliert wird und andererseits die Wirkung der Steroide insgesamt an den entsprechenden Zellen beeinflusst. Das LH ist für die Aufrechterhaltung des nach der Ovulation durch Luteinisierung der Granulosa- und Theka-interna-Zellen des Follikels entstehenden Corpus luteum verantwortlich. Die Anzahl der LH-Rezeptoren in diesem Gewebe fallen nach der Ovulation vorerst wieder ab, steigen jedoch in der frühen Lutealphase wieder an und erreichen ein Maximum der Expression in der mittleren Lutealphase. Parallel zu dieser Entwicklung verläuft auch die Progesteronbiosynthese in den Zellen des C.I. (PETRIDES 2003).

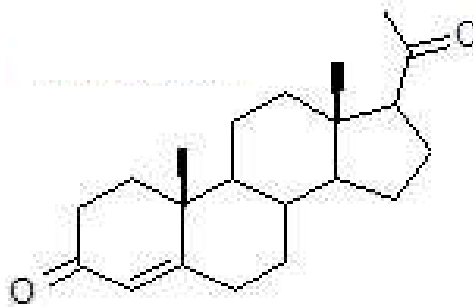


Abb. 2.3: Darstellung der Struktur des Progesterons (21 C-Atome).
(Quelle: de.wikipedia.org/wiki/Progesteron)

Für die Vermittlung der Progesteronwirkung steht ein kernständiger Rezeptor zur Verfügung, dessen Wirkungsmechanismus dem des Östradiolrezeptors ($ER\alpha+\beta$) entspricht (siehe Kap. 2.2.1.3). Die Progesteronrezeptor-Expression im Zielgewebe (z.B. Uterus) wird schon während der Follikelphase durch Östradiol gefördert (FUNK u. DEMAYO 1999).

Progesteron führt während des weiblichen Zyklus zum Wachstum des Uterus sowie zur Umwandlung des Endometriums von der Proliferations- in die Sekretionsphase. Damit sorgt es für ein adäquates Milieu sowohl für eine mögliche Einnistung eines befruchteten Eies als auch für die Entwicklung des daraus entstehenden Embryos (PETRIDES 2003; FUNK u. DEMAYO 1999).

Bleibt eine Befruchtung aus, so fällt neben Östradiol auch die periphere Progesteronkonzentration zum Ende des Zyklus wieder ab. Damit verbunden ist ein Abstoßen der unter dem Progesteroneinfluss aufgebauten Uterusschleimhaut in der Menstruationsphase.

Findet eine Befruchtung statt, wandelt sich das Corpus luteum in das Corpus luteum graviditatis um, welches eine gesteigerte Progesteronsynthese aufweist. Während der frühen Gravidität sorgen u.a. Prolaktin (Nager) und Choriongonadotropin (Mensch) für den Erhalt der C.I.-Funktion (FUNK u. DEMAYO 1999). Die Progesteronsynthese wird später entsprechend dem Östradiol von der Plazenta übernommen, wodurch sich der Gelbkörper bis zum Ende der Gravidität allmählich zurückbildet (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 1991). Progesteron verhindert eine erneute Ovulation, indem es durch Rückkopplung die hypophysäre LH-Produktion hemmt und unterstützt damit die Aufrechterhaltung der

Gravidität (PETRIDES 2003). Diese wird weiterhin unterstützt durch eine kontraktionshemmende Wirkung des Progesterons auf das Myometrium (RICHTER u. GÖTZE 1993). Das Ende der Gravidität und damit das Eintreten der Geburt sind mit einem drastischen Abfall der Progesteronkonzentration verbunden, so dass die graviditätserhaltende Funktion rapide nachlässt (FUNK u. DEMAYO 1999) (siehe Abschnitt 2.1.3).

Während der Gravidität bewirkt Progesteron weiterhin im Mammagewebe die Ausbildung eines sekretionsfähigen Milchgangesystems in Vorbereitung auf die nach der Geburt bevorstehende Milchproduktion (PETRIDES 2003).

2.2.3 Relaxin

2.2.3.1 Hormongruppe und Struktur

Relaxin (RLX) ist ein Peptidhormon. Es gehört zusammen mit Insulin, den insulinähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-1 und -2 und dem relaxinähnlichen Faktor (RLF/INSL3) in eine Familie von stoffwechselaktiven Wachstumsfaktoren („Insulinfamilie“) (IRVING-RODGERS et al. 2002; IVELL u. EINSPANIER 2002). Es existieren 3 humane Relaxingene, RLX1 oder H1, RLX2/H2 und RLX3/H3, wobei das RLX2/H2 das dominanter zu sein scheint (ANTHONY 1999; BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994). Die Menschenaffen Gorilla, Schimpanse und Orang-Utan besitzen je 2 Relaxingene (RLX1+2). Andere Affenarten wie Rhesus-Affen und Paviane oder Nicht-Primaten wie Schweine, Hunde oder Haie etc. besitzen dagegen in der Regel nur ein Relaxingen (RLX2) (IVELL u. EINSPANIER 2002; BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994). Für Ratten und Mäuse wurde zusätzlich zum RLX2-Gen analog zum menschlichen H3-Gen ebenfalls ein RLX3-Gen (R3 bzw. M3) nachgewiesen (BATHGATE et al. 2002; BURAZIN et al. 2002).

In der Struktur ist das Relaxin ähnlich wie das Insulin ein Heterodimer aus einem A- oder α - und einem B- oder β -Strang (IVELL u. EINSPANIER 2002; ANTHONY 1999). Diese sind durch 2 intermolekulare Disulfidbrücken verbunden, die jeweils zwischen zwei Zysteinresten liegen. Der A-Strang weist zusätzlich eine intramolekulare Disulfidbrücke auf (Abb. 2.4a).

An seinem N-terminalen Ende befindet sich eine α -Helix, die wichtig ist für die Aktivität des Moleküls. Der für die Rezeptorbindung zuständige B-Strang weist gewisse Variationen am N- und C-terminalen Ende auf, zwischen denen hoch konservierte Bereiche liegen. Von besonderer Bedeutung ist hier das Glycin an Position B24. Befindet sich an dieser Stelle D-Alanin, wird die Rezeptorbindung verschlechtert (BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994). Das im Prorelaxin (siehe Punkt 2.2.2.2 „Synthese und Zirkulation“) den A- und B-Strang verbindende C-Peptid ist mit 100 Aminosäuren relativ lang und hoch konserviert (ANTHONY 1999; BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994).

Die Aminosäuresequenzen von Relaxin und Insulin unterscheiden sich zu 70%. Die Relaxinsequenzen verschiedener Spezies variieren zu 45-60% (BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994). Die Sequenz des *Callithrix jacchus*-Relaxingens weist eine 70%ige Homologie zum menschlichen H2-Gen auf (EINSPANIER et al. 1997).

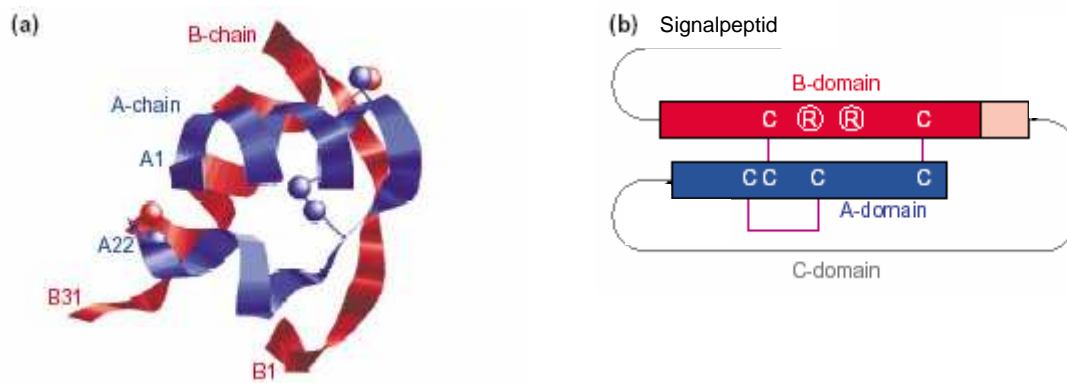


Abb. 2.4 : Struktur des Relaxins **a)** dreidimensionale Struktur des Relaxinmoleküls, Heterodimer aus A-Strang (A-chain, blau) und B-Strang (B-chain, rot) mit inter- und intramolekularen Disulfidbrücken; **b)** schematische Darstellung des Präprorelaxins mit Signalpeptid, B-Strang (B-domain, rot), C-Peptid (C-domain) und A-Strang (A-domain, blau); Disulfidbrücken zwischen den Zysteinresten (C) sind violett dargestellt, im B-Strang befindliche Argininreste (R) sind an der Rezeptorbindung beteiligt.
(nach IVELL u. EINSPANIER 2002)

2.2.3.2 Synthese und Zirkulation

Die Synthese des Relaxins verläuft wie die des Insulins nach dem für die Proteinbiosynthese typischen Schema der posttranslationalen Prozessierung durch limitierte Proteolyse (LÖFFLER et al. 2003). Relaxin wird als Präpropeptid synthetisiert (Abb. 2.4b). Dieses enthält das Signalpeptid, den A- und B-Strang und das C-Peptid. Das Signalpeptid wird nach Einschleusung aus dem Zytosol in das Endoplasmatische Retikulum abgespalten. Somit entsteht das Prorelaxin. Das C-Peptid wird nach der Faltung des Moleküls und der Ausbildung der charakteristischen Disulfidbrücken direkt vor der Sekretion ebenfalls abgespalten und es entsteht das aktive Relaxin (ANTHONY 1999).

Die Orte der Relaxinsynthese sind sehr vielfältig und speziesspezifisch. Hauptproduktionsort sowohl beim Menschen als auch bei Tieren wie z.B. Ratte und Schwein ist das C.I. (ANTHONY 1999; BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994). Es gibt Relaxin in das Blutgefäßsystem ab und sorgt damit für eine systemische Zirkulation (BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994). Bei anderen Tierarten wie Hund, Katze, Pferd, Hamster und Kaninchen ist die Plazenta die Hauptquelle für Relaxin, beim Meerschweinchen der Uterus. Bei Schaf, Rind und anderen Wiederkäuern ist im C.I. offensichtlich keine adäquate Relaxinsynthese vorhanden. Bei diesen Tieren wird allerdings der relaxinähnliche Faktor (RLF/INSL3) gebildet (ANTHONY 1999). Er wurde als insulin- bzw. relaxinähnliches Peptid in den Leydigzellen des Hodens entdeckt und steht im Zusammenhang mit dem Hodenabstieg bzw. bei Mangel mit einem Kryptorchismus (IVELL u. EINSPANIER 2002; NEF u. PARADA 1999). Der RLF fördert das Wachstum und die Differenzierung des Gubernaculum testis und wirkt somit positiv auf den Abstieg der Gonaden. Bei Mensch,

Schwein und Maus ist beim weiblichen Individuum nur eine geringe Synthese des RLF im Uterus, im Ovar und im Mammagewebe nachweisbar (IVELL u. EINSPANIER 2002; HOMBACH-KLONISCH et al. 2000). Beim Rind wurde seine Synthese in gleichem Maße sowohl in männlichen als auch in weiblichen Gonaden beschrieben. Bei weiblichen Tieren scheint RLF die Rolle des fehlenden Relaxins zu ersetzen (ANTHONY 1999; BATHGATE et al. 1999).

Für das Relaxin existieren auch beim Menschen im Allgemeinen neben dem C.I. weitere Synthesorte. Das Endometrium bzw. die Plazenta und Dezidua sind wichtige extra-ovarielle Ressourcen des Hormons. Weiterhin wird es im Mammagewebe synthetisiert und offenbar ins Lumen sezerniert, denn es kann in der Milch nachgewiesen werden (BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994; TASHIMA et al. 1994).

Beim männlichen Individuum wird Relaxin in der Prostata oder wie beim Schwein in der Samenblasendrüse synthetisiert (ANTHONY 1999; BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994). Außerhalb der für die Reproduktion wichtigen Organe wird RLX im Gastrointestinaltrakt, in der Niere, in der Lunge, im Herzvorhof und im Gehirn/ZNS gebildet (BATHGATE et al. 2002; BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994).

Das beim Menschen und anderen Primaten v.a. im C.I. produzierte Relaxin wird in sekretorischen Granula gespeichert und nach seiner Freisetzung im Blut zu den Zielorganen transportiert (ANTHONY 1999). Die peripheren Relaxinkonzentrationen steigen bei der Frau im Zyklus ca. 6 Tage post ovulationem (p.ov.) an und erreichen ein Maximum um den 10. Tag p.ov. mit einem Wert von rund 100 pg/ml. Danach fallen die Werte bei einer nicht graviden Frau rasch wieder ab (BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994). Im Falle einer Konzeption steigen laut diesen Autoren die Konzentrationen auch nach dem 10. Tag p.ov. steil und stetig an, bis sie in der 10. Graviditätswoche Werte von ca. 900 pg/ml erreichen. Danach sinken die Relaxinspiegel im Serum wieder allmählich ab und bleiben bis zur Geburt auf einem relativ konstanten Wert um 500 pg/ml. PETERSEN et al. (1995) berichten über einen Anstieg der Relaxin-Konzentrationen im Serum von Frauen in der 10.-14. Graviditätswoche mit durchschnittlichen Werten von 2231 pg/ml. In der 16.-22- Woche sind noch Konzentrationen von 1326 pg/ml zu verzeichnen. Diese sinken bis zur 24. Woche auf Werte um 931 pg/ml ab und bleiben relativ konstant bis zur Geburt. Vor der Geburt ist teilweise ein leichter Anstieg der Serum-Relaxin-Konzentrationen zu sehen, der aber nicht signifikant unterschiedlich zu den durchschnittlichen Konzentrationen während des letzten Schwangerschaftstrimesters ist. Der frühgravide Relaxinanstieg wird beim Menschen stimuliert durch das humane Choriongonadotropin (hCG), dessen periphere Hormonkonzentrationen zu diesem Zeitpunkt einen ähnlichen Verlauf zeigen wie die des Relaxins (JAFTE 1999).

Beim Weißbüschelaffen sind die Serum-Relaxinkonzentrationen während der Follikelphase ebenfalls vergleichsweise gering (ca. 0,3 ng/ml), steigen um den Ovulationszeitpunkt an und erreichen ein Maximum von ca. 1,5 ng/ml in der späten Lutealphase, bevor sie wieder abfallen. Findet eine Konzeption statt, sind in der Frühgravidität Werte um 1,0 ng/ml vorhanden, die weiter ansteigen, die Werte in der Lutealphase übertreffen und im 2. Graviditätsdrittel ein Maximum mit Serum-Relaxinspiegeln von bis zu 15 ng/ml erreichen. Im letzten Graviditätsdrittel sinken die Werte wieder auf basale Konzentration ab (EINSPANIER et al. 1999).

An diesen Hormonprofilen ist einerseits zu sehen, dass der weibliche Weißbüschelaffe insgesamt höhere Serum-Relaxinspiegel als die Frau aufweist. Beide, Mensch und *Callithrix jacchus*, haben jedoch weitaus geringere Relaxinspiegel als beispielsweise die Ratte (siehe Abb. 2.5). Andererseits ist sowohl beim Menschen als auch beim Weißbüschelaffen mit einem Maximum der Relaxinkonzentration am Ende des ersten bzw. zu Beginn des zweiten Graviditätsdrittels ein anderes Bild des Verlaufes der Serum-Relaxinkonzentration zu sehen als beispielsweise bei Ratte und Schwein. Bei diesen Tieren (siehe Abb. 2.5a für die Ratte) ist erst ca. 2 Tage vor der Geburt ein markanter Anstieg der Relaxin-Konzentration zu verzeichnen (ANTHONY 1999; BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994). Aufgrund der Tatsache, dass dies beim Menschen nicht zu sehen ist, sondern die Relaxinkonzentrationen vor der Geburt auf einem basalen Wert bleiben und zudem auch noch viel niedriger sind als bei Ratte und Schwein (siehe Abb. 2.4b), ist man lange Zeit davon ausgegangen, dass Relaxin hier zum Zeitpunkt der Geburt nicht die gleiche Rolle spielt, wie bei diesen Tieren (BRENNAND et al. 1997; PETERSEN et al. 1995).

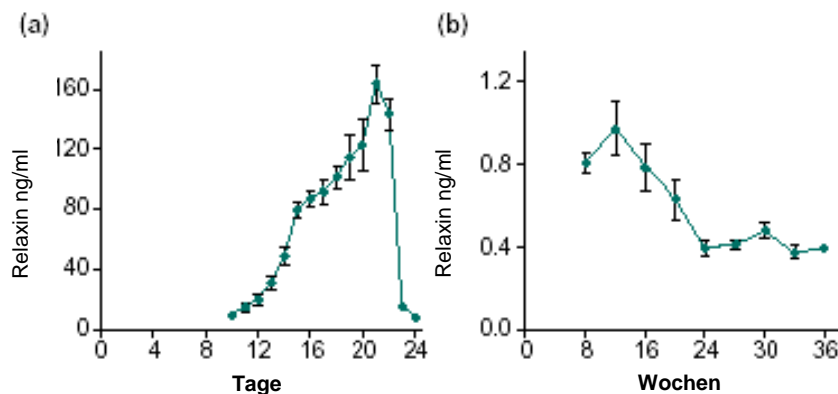


Abb. 2.5 : Serumrelaxinspiegel während der Gravidität bei der Ratte (a) und bei der Frau (b) (IVELL u. EINSPANIER 2002)

2.2.3.3 Wirkungsmechanismus

Relaxin wirkt über die Bindung an membranständige Rezeptoren (ANTHONY 1999). Diese Rezeptoren wurden erst im Jahr 2002 von HSU et al. beschrieben. Sie gehören in die Gruppe der G-Protein-gekoppelten 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren (Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled Receptors, LGR). Es gibt 2 Rezeptoren, an die Relaxin binden kann, LGR7 und LGR8. Beim Menschen hat Relaxin eine höhere Affinität zu LGR7, wohingegen LGR8 hauptsächlich mit dem relaxinähnlichen Faktor (RLF/INSL3) interagiert (SUDO et al. 2003; HSU et al. 2002).

Für die Signaltransduktion werden in der Literatur verschiedene Möglichkeiten angegeben. Eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Einwirkung von Relaxin wurde schon vor der Entdeckung eines Relaxinrezeptors in Zellkulturen oder in den Zellen des Zielgewebes (z.B. glatte Muskelzellen, endometriale Stromazellen) festgestellt (IVELL u. BATHGATE 2002; SANBORN et al. 1980). Der Anstieg der cAMP-Konzentration ist dabei

dosis- und zeitabhängig (KRAMER et al. 1990). Er wird offenbar durch Aktivierung der Adenylatzyklase über ein stimulierendes G-Protein bewirkt (IVELL u. EINSPANIER 2002). Es ist aber festgestellt worden, dass die cAMP-Freisetzung aus solchen Zellen durch Tyrosinkinase-Rezeptor-Inhibitoren unterdrückt werden kann (PALEJWALA et al. 2001). Deshalb wird alternativ eine Transduktion über eine zudem schnellere Tyrosinkinase-Kaskade für möglich erachtet, wie sie auch beim Insulin-Rezeptor vorkommt. Die Details der einzelnen Kaskaden und die Frage, ob diese beiden Wege tatsächlich nebeneinander existieren oder letztendlich nur einer davon in Frage kommt bzw. weitere Möglichkeiten existieren, sind noch nicht geklärt.

2.2.3.4 Wirkungen in den Zielorganen

Wie man heute weiß, sind die biologischen Wirkungen von Relaxin sehr vielfältig und werden nicht nur von systemisch zirkulierendem, sondern auch von lokal produziertem und parakrin bzw. autokrin wirkendem Relaxin hervorgerufen (BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994). Die Wirkungen werden durch das Vorhandensein der Relaxinrezeptoren im Zielgewebe vermittelt (IVELL et al. 2003).

Relaxin hat zwei klassische und seit langem bekannte Funktionen: einerseits die schnelle Unterdrückung myometrialer Aktivität, andererseits die Erweiterung der Beckensymphyse durch Hervorrufen von Veränderungen in der Bindegewebestruktur dieses Zielorgans (IVELL u. EINSPANIER 2002; ANTHONY 1999).

Klassische Nachweise für die Wirkung des Relaxins auf das Bindegewebe sind der Maus-Bioassay (mouse-interpubic-ligament-bioassay) und die Untersuchungen von humanen Hautfibroblasten in Zellkulturen (BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994).

Lokal durch Relaxin hervorgerufene Wirkungen auf das Bindegewebe des Reproduktionstraktes betreffen v.a. das Ovar mit den Follikeln, den Uterus und die Zervix sowie die fetalen Membranen (BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994).

Im **Ovar** agiert Relaxin als ein intrafollikulärer Regulator der Ovulation. Relaxin ist in Kulturen von porzinen Follikelwandzellen und in porziner Follikelflüssigkeit nachgewiesen worden. Als Produktionsort wurden die Thekazellen identifiziert. Relaxin stimuliert offenbar die lokale Produktion von Enzymen wie dem Gewebe-Plasminogenaktivator (tissue plasminogen activator – tPA), Kollagenasen und Proteoglykanasen, die zur Erweichung der Follikelwand vor der Ruptur führen.

Am **Uterus** fördert Relaxin das Wachstum dieses Organs durch eine Erhöhung der Wassereinlagerung und der Proteinbiosynthese, was bei Ratten nachgewiesen wurde. Diese Effekte werden durch Östrogene unterstützt und evtl. wie für Mensch und Schwein nachgewiesen, durch Stimulation von IGFs vermittelt (ANTHONY 1999). Im Endometrium spielt das Relaxin wahrscheinlich eine autokrine/parakrine Rolle zusammen mit anderen Peptiden wie Prolaktin und dem IGF-bindenden Protein-1 in bezug auf Wachstum und Differenzierung des Gewebes (BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994). Relaxin hat weiterhin eine vasoaktive Wirkung (ANTHONY 1999). Diese wird z.B. im Endometrium durch eine dosis- und zeitabhängige Stimulation der Sekretion des VEGF hervorgerufen. Erhöhte Mengen an VEGF führen zu einer Neovaskularisierung des endometrialen Gewebes (UNEMORI 1999).

Die **fetalen Membranen** stellen ein Ziel dar für Relaxin, dass lokal in Dezidua und Plazenta produziert wird und durch Rezeptoren an den fetalen Membranen seine Wirkung entfalten kann (QIN et al. 1997a). Das Relaxin stimuliert hier die Expression von MMPs (MMP-1, -2, -3 und -9) sowie des TIMP-1 (QIN et al. 1997b; BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994). Durch Einwirkung von Relaxin kann die Expression sowohl der MMPs als auch des tPA in diesem Gewebe erhöht werden. Die endogene Aktivierung der MMP-Expression erfolgt eventuell über die Stimulation des Zytokins IL-1 β (v.a. MMP-1) und/oder des tPA (QIN et al. 1997a). Die durch die MMPs hervorgerufenen kollagenolytischen Prozesse verlaufen in 2 Phasen. In den letzten ca. 8 Wochen der Schwangerschaft findet bei der Frau ein langsamer, kontrollierter Abbau des Kollagen III im humanen Amnion statt, der durch Lockerung des Gewebes eine Anpassung an das schnelle Wachstum des Uterusinhaltes ermöglicht. In der zweiten Phase kommt es zu schnellen kollagenolytischen Vorgängen während der Geburt, die zum Ablösen der Dezidua/Plazenta von der Uteruswand sowie zur Ruptur der Membranen führen (BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994).

Die bei Schwein und Ratte kurz vor der Geburt ansteigenden peripheren Relaxinkonzentrationen konnten direkt mit einer Erweichung der **Zervix** in Verbindung gebracht werden. Man hat herausgefunden, dass obwohl ein solcher Relaxinanstieg bei der Frau nicht zu verzeichnen ist, eine zervikale Erweichung und damit eine Verkürzung der Geburt mittels lokaler intrazervikaler Applikation von porzinem oder rekombinantem humanen Relaxin auch beim Menschen hervorgerufen werden kann (BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994). Das Hormon Relaxin kann, wie bei Untersuchungen an der Ratte nachgewiesen, an den Epithelzellen und glatten Muskelzellen der Zervix binden (KUENZL und SHERWOOD 1995). Offenbar spielt wiederum lokales Relaxin eine Rolle bei der Stimulation der für die Erweichung notwendigen Enzyme. LENHARDT et al. (2001) haben durch Untersuchungen beim Schwein eine durch Relaxin gesteigerte Synthese der MMP-2 und MMP-9 in der Zervix nachgewiesen.

Außerhalb der weiblichen Reproduktionsorgane wirkt Relaxin auch auf das Mammagewebe, was sich in einem wachstums- und entwicklungsfördernden Effekt auf die Milchdrüse äußert, der vermutlich östrogenabhängig ist.

Das in der männlichen Samenflüssigkeit enthaltene Relaxin hat einen positiven Effekt auf die Spermienmotilität und unterstützt die Passage der Spermien durch den weiblichen Reproduktionstrakt (KOHSAKA et al. 2003; BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994).

Weiterhin übt Relaxin nachgewiesenermaßen einen anti-fibrotischen Effekt auf das Bindegewebe der Lunge, des Herzens und der Nieren aus (BATHGATE et al. 2003; DU et al. 2003; SAMUEL et al. 2003b; DSCHIETZIG et al. 2001; GARBER et al. 2001). Durch Untersuchungen an RLX-Knock-out-Mäusen konnte eine gesteigerte Fibrosierung des jeweiligen Gewebes festgestellt werden. In der Regel war es möglich, diese fortschreitenden Veränderungen durch systemische Verabreichung von Relaxin zu stoppen oder sogar rückgängig zu machen. Neben dem anti-fibrotischen Einfluss auf die genannten Organe konnte für die Gefäße des Herzens und der Niere weiterhin ein anti-vasokonstriktorisches bzw. vasodilatatorisches Effekt nachgewiesen werden (SAMUEL et al. 2003a).

2.3 Tiermodell Weißbüschelaffe

Weißbüschelaffen (Abb. 2.6) sind seit längerer Zeit in der reproduktionsbiologischen Forschung als Versuchstiere etabliert (FRASER u. LUNN 1999). Sie zeichnen sich durch geringe Größe und den dadurch erleichterten Umgang mit dem Tier sowie durch eine gute Fruchtbarkeit ohne Saisonalität und hohe Nachkommensrate aus (HEARN 1983). Aufgrund ihrer phylogenetischen Nähe zum Menschen finden die Weißbüschelaffen mit Erfolg als Modelltier in der humanen Forschung Anwendung. Sie sind deswegen auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt worden. In den folgenden Abschnitten soll näher auf diese Tiere eingegangen sowie ihre Eignung als reproduktionsbiologisches Modelltier für den Menschen näher erläutert werden.



Abb. 2.6: Der Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*)

2.3.1 Allgemeine Angaben

Der Weißbüschelaffe, *Callithrix jacchus* (im Englischen: Common Marmoset), ist als Neuweltaffe in den Regenwäldern Ostbrasilens beheimatet. Er gehört in die Familie der Krallenaffen (Callitrichidae). Diesen Namen verdanken die Tiere ihren schmalen, krallenartig verlängerten Nägeln an den Fingern und Zehen. Nur an der Großzehe kommt ein breiter, hohlziegelförmiger Nagel vor. Die Krallen brauchen die Affen, um besser klettern zu können (ROWE 1996a). Sie sind sehr gut an das Baumleben angepasst und betreten so gut wie nie den Erdboden (WENDT 1993). Sie haben sehr kräftige, und v.a. im Unterkiefer lange Incisivi (GEISSMANN 2003; WENDT 1993) und lange Finger, mit deren Hilfe sie Löcher in die Gummibäume ihres natürlichen Lebensraums bohren, um deren Exsudat zu gewinnen (ROWE 1996a).

Zur Familie der Krallenaffen gehören die Marmoseten mit den Gattungen *Callithrix*, *Cebuella*, *Mico* (Büscheläffchen und Seidenäffchen) und *Callimico* (Springtamarine) sowie die Tamarine der Gruppen *Saguinus* (Tamarine) und *Leontopithecus* (Löwenäffchen). Die Familie der Callitrichidae gehört zur Überfamilie der Ceboidea innerhalb der Gruppe der Platyrrhini (Neuweltaffen) (GEISSMANN 2003). Die Gruppe der Neuweltaffen wiederum ist Teil der Infraordnung Anthropoidae, die zur Unterordnung Haplorrhini (Trockennasen-

primaten) gehören (GEISSMANN 2003; ROWE 1996a). Die Trockennasenprimaten gehören letztendlich der Ordnung der Primaten an (GEISSMANN 2003).

Auffälligstes Charakteristikum des Weißbüschelaffen und dessen Namensgeber sind die langen weißen Ohrbüschel (WENDT 1993). Die Tiere haben eine Scheitel-Steiß-Länge von 158 bis 207 mm. Der Schwanz weist eine Länge von 243-312 mm auf. Das Gewicht freilebender Tiere beträgt rund 250 Gramm, Tiere in Gefangenschaft sind mit rund 400 g deutlich schwerer (ROWE 1996a; HEARN 1983). Das natürliche Nahrungsspektrum umfasst Früchte, kleine Tiere (z.B. Insekten) und Gummi arabicum, das mit 15% der Gesamtfuttermenge einen deutlich höheren Stellenwert einnimmt als bei anderen Marmoseten (ROWE 1996a; HEARN 1983). Das Exsudat der Gummibäume stellt eine bedeutende Kohlenhydrat- und Kalziumquelle dar. Insekten wie Heuschrecken oder Mehlwürmer sind wichtige Protein- und Fettlieferanten. Die Tiere verbringen einen großen Teil ihrer Zeit mit der Futtersuche und -aufnahme (CARROLL 1997).

Die Affen leben in unterschiedlichen Gruppenverbänden. Es kommen Gruppen mit patriarchalen und matriarchalen Strukturen vor. Eine Gruppe umfasst 3-20 Tiere und sie herrscht über ein ebenso variables Territorium von ca. 0,5-6,5 ha Größe (ROWE 1996a).

Weißbüschelaffen werden ca. 11,7 Jahre alt (WENDT 1993). Die Geschlechtsreife tritt bei weiblichen Tieren im Alter von 12 Monaten und bei den männlichen Tieren mit 16,7-18 Monaten ein (HEARN 1983). Ein Östruszyklus dauert ca. 28 Tage (FRASER u. LUNN 1999; HEARN 1983). Die Gravidität erstreckt sich über 144–148 Tage (WENDT 1993; HEARN 1983). Es werden hauptsächlich Mehrlinge (Zwillinge und Drillinge) geboren (siehe auch Tabelle 2.1). Aufgrund der relativ langen Gravidität kommen weit entwickelte Junge zur Welt (HEARN 1983). Sie haben meist schon am ersten Tag die Augen geöffnet (WENDT 1993). Die Fortpflanzung zeigt keine saisonalen Schwankungen. Geburten finden über das ganze Jahr statt (HEARN 1983). Das Geburtsintervall beträgt 5,1 Monate, da der erste Östrus bereits 9-10 Tage post partum wieder einsetzt (ROWE 1996a). Die Säugeperiode dauert ca. 6-12 Wochen.

In den Gruppen freilebender Weißbüschelaffen pflanzt sich meist nur das dominante Weibchen fort und die Nachkommen werden von der gesamten Gruppe aufgezogen. Auch die männlichen Tiere haben dabei ihre Aufgabe. Die Jungen werden in den ersten Lebenstagen neben den „Tanten“ hauptsächlich vom Vater getragen (ROWE 1996a; WENDT 1993).

2.3.2 Der Weißbüschelaffe als Modelltier in der reproduktionsbiologischen Forschung

Weißbüschelaffen züchten in Gefangenschaft besser und schneller als andere Primaten. Ihre hohe Fruchtbarkeit übertrifft die von vielen anderen Spezies (LUNN 1997). Ausgewählte Reproduktionsdaten von Weißbüschelaffen im Vergleich mit Rhesusaffen und Pavianen sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Aufgrund ihrer geringen Größe können die Weißbüschelaffen gut in Familienverbänden gehalten werden, was Verhaltensanomalien vorbeugt. Paviane und Rhesusaffen sind bedeutend größer als Weißbüschelaffen (HEARN 1983). Sie benötigen daher mehr Platz und sind weniger einfach zu handhaben, weshalb sie in den meisten Versuchstierkolonien einzeln gehalten werden. Weißbüschelaffen können relativ gut an die Bedingungen in Gefangenschaft, an das Handling, Probensammeln und die

Versuchsprozeduren gewöhnt werden und sind mit vergleichsweise wenig finanziellem Aufwand zu halten (HEARN 1983).

Ihre natürlichen Reproduktionsdaten (siehe Tabelle 2.1) wie die frühe Geschlechtsreife, Mehrfachovulationen, Asaisonalität der Fortpflanzung, keine Laktationsanöstrie und damit ein kurzes Generationsintervall verschaffen ihnen einen Vorteil in der reproduktionsbiologischen Forschung (FRASER u. LUNN 1999; TORII et al. 1987; HEARN 1983). Wie aus Tabelle 2.1 zu entnehmen ist, liegt die „Ausbeute“ an Nachkommen mit durchschnittlich 5 Jungen pro Weibchen und Jahr bei den Weißbüschelaffen insgesamt bedeutend höher als z.B. bei Pavianen und Rhesusaffen. Außerdem tritt die Geschlechtsreife bei diesen Tieren sehr viel später ein als beim Weißbüschelaffen (ROWE 1996b). Paviane und Rhesusaffen haben zudem eine längere Trächtigkeit, zeigen eine Laktationsanöstrie und weisen somit ein verlängertes Generationsintervall auf. Weiterhin kommt bei Rhesusaffen eine saisonale Fortpflanzung vor und bei Pavianen ist der Zyklus deutlich länger als bei den Weißbüschelaffen (HEARN 1983).

Tabelle 2.1: Durchschnittliche Reproduktionsdaten von weiblichen Weißbüschelaffen, Rhesusaffen und Pavianen im Vergleich (modifiziert nach HEARN 1983)

Parameter weibl. Tiere	Weißbüschelaffe	Rhesusaffe	Pavian
Körpergewicht	300-400 g	3-7 kg	8-15 kg
Geschlechtsreife	18 Monate	42-48 Monate	54 Monate
durchschnittliche Zykluslänge	28 Tage	28 Tage	35 Tage
Mehrfachovulationen	2-4	i.d.R. keine	i.d.R. keine
Graviditätsdauer	144 Tage	165 Tage	185 Tage
Laktationsanöstrie	keine	1 Jahr	1-2 Jahre
Generationsintervall	1,5-2 Jahre	4-6 Jahre	5-7 Jahre
Saisonalität in der Fortpflanzung	keine	vorhanden	keine
Junge pro Weibchen u. Jahr	5	1	0,8

Der ovarielle Zyklus des Weißbüschelaffen entspricht dem der Frau mit ebenfalls 28 Tagen Gesamtzykluslänge (siehe Zyklusprofile, Abb.2.7). Beim *Callithrix jacchus* entfallen auf die Follikelphase rund 8 bis 10 Tage und auf die Lutealphase dementsprechend ca. 18 bis 20 Tage (EINSPANIER et al. 1999; FRASER u. LUNN 1999; NUBBEMEYER et al. 1997; HEARN 1983). Bei der Frau beträgt die Länge der Follikelphase ebenfalls 10 Tage und die der Lutealphase 14 Tage. Hier kommt anders als beim Weißbüschelaffen noch eine Menstruationsphase von 4 Tagen hinzu (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 1991).

Trotz der bei den Weißbüschelaffen auftretenden höheren Steroidhormonkonzentrationen entsprechen die Verläufe der Plasma-Steroidhormonspiegel auch während der Gravidität denen des Menschen (siehe Abb. 2.8). Es ist ein markanter Anstieg der Steroidhormonkonzentration in der zweiten Graviditätshälfte beim Weißbüschelaffen (EINSPANIER et al. 1999) und im letzten Trimester bei der Frau zu sehen (HEARN 1983).

Neben den aufgeführten Vorteilen bringt der Weißbüschelaffe aber auch Nachteile mit sich. Es gibt keine äußeren Anhaltspunkte für den Zyklusstand wie Veränderungen im vaginalen

Epithel oder eine Menstruation (FRASER u. LUNN 1999). Allerdings sind die Tiere empfindlich gegenüber PGF2 α bzw. synthetischen Analoga (SUMMERS et al. 1985), so dass durch induzierte Luteolyse und Bestimmung der Blut-Progesteronwerte (FRASER u. LUNN 1999) der Zyklus kontrolliert und eine unerwünschte Gravidität verhindert werden kann. Weiterhin bedingt die geringe Größe der Tiere eine Begrenzung der Blutprobengewinnung, da sonst die Gefahr einer Anämie besteht. Die Blutspiegel der Steroidhormone sind allerdings wie bereits erwähnt im Vergleich mit Altweltaffen und Menschen sehr hoch. Die Progesteronwerte des Weißbüschelaffen sind 10-50fach höher als bei weiblichen Altweltaffen und Frauen (TORII et al. 1987; HEARN 1983). Deswegen reichen i.d.R. auch kleine Mengen an Blut für die Bestimmung der Hormonwerte aus (FRASER u. LUNN 1999).

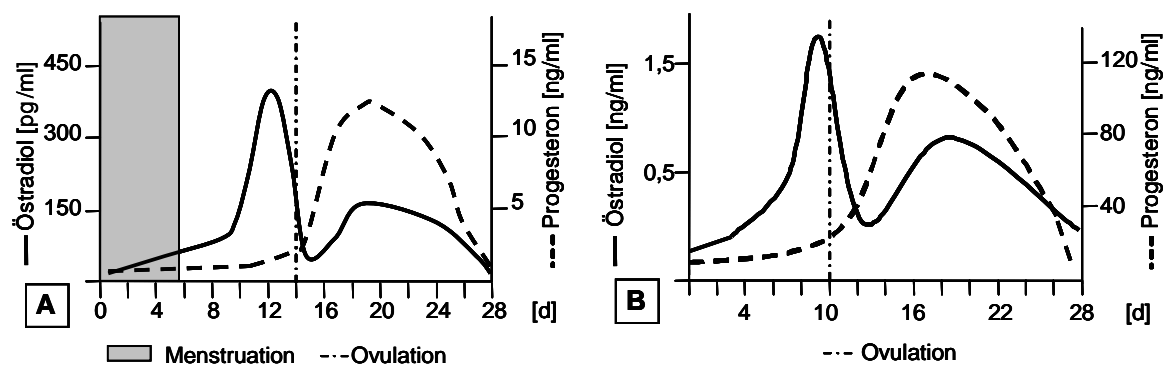


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der peripheren Progesteron- und Östradiolkonzentrationen des Menschen (A) und Weißbüschelaffen (B) während des weiblichen Sexualzyklus (modifiziert nach SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 1991; HEARN 1983)

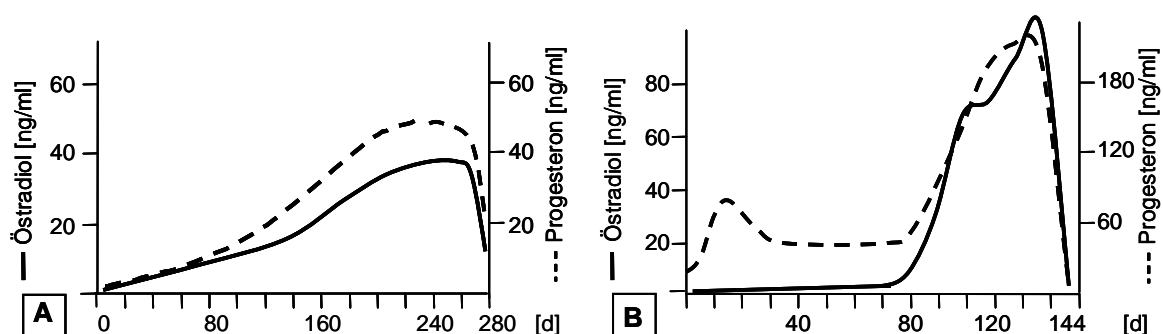


Abb. 2.8: Schematische Darstellung der peripheren Progesteron- und Östrogenkonzentrationen des Menschen (A) und Weißbüschelaffen (B) während der Gravidität (modifiziert nach LÖFFLER u. PETRIDES 2003; SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 1991; HEARN 1983)

Zusammengefasst stellt der Weißbüschelaffe ein gutes Modelltier für die Forschung auf dem Gebiet der humanen Reproduktionsbiologie dar (FRASER u. LUNN 1999). Nach HEARN (1983) sind die Weißbüschelaffen eine gut etablierte und gut in Gefangenschaft züchtende Primatenart. Jedes Versuchstiermodell weist jedoch Vor- und Nachteile auf und hat in der Nutzung seine individuellen Grenzen. Keine einzelne nichtmenschliche Primatenart kann als ein ideales Modell für den Menschen bezeichnet werden (FRASER und LUNN 1999). Doch sind Affen an sich in ihrer Anatomie, Physiologie und Endokrinologie dem Menschen unbestritten näher als z.B. Nagetiere und Schweine. Trotzdem sollten auch an Primaten erarbeitete Ergebnisse nicht vorbehaltlos auf den Menschen übertragen werden. Sie stellen allerdings eine wichtige Annäherung an die humane Situation dar, die auch in der vorliegenden Arbeit genutzt werden soll.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Die in die Versuche der vorliegenden Arbeit aufgenommenen Weißbüschelaffen entstammen der Versuchstiereinheit des Deutschen Primatenzentrums (DPZ) in Göttingen, wo auch alle experimentellen Versuche durchgeführt wurden. Alle Tiere wurden in Gefangenschaft geboren. Die weiblichen Tiere wurden mit einem fertilen Männchen verpaart und mit diesem in Käfigen mit den Abmessungen 80x50x100 cm gehalten. Die standardisierten Haltungsbedingungen beinhalteten ca. 26°C Raumtemperatur, ca. 60% relative Luftfeuchtigkeit und eine durchschnittliche Beleuchtungsdauer von 12 Stunden täglich.

Die Grundlage der Ernährung bilden frisches Obst und Gemüse, ein täglich frisch zubereiteter Brei mit Gummi arabicum, Fertigpellets (ssniff Marmoset 4mm V-Alleinfutter, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und zusätzlich je nach Angebot Geflügelfleisch, Eier oder Nudeln. Zugang zu Trinkwasser ist ständig vorhanden.

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Versuche wurden unter der Tierversuchsnummer 509.42502/08-03.99 (V1) von der Bezirksregierung Braunschweig genehmigt.

Versuchstiere der beschriebenen Weißbüschelaffen-Kolonie wurden für zwei unterschiedliche Versuchseinheiten genutzt: einerseits wurde ein *in vivo*-Versuch zur Messung des Zervix-Innendurchmessers durchgeführt (siehe Punkt 3.1.1.1), andererseits wurden von weiteren Tieren Zervices für histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen gewonnen (siehe Punkt 3.1.1.2).

3.1.1.1 *In vivo*-Versuch

Für den *in vivo*-Versuch zur Bestimmung des Zervix-Innendurchmessers (siehe Punkt 3.2.2) wurden 10 weibliche Tiere der unter Punkt 3.1.1 beschriebenen Weißbüschelaffen-Kolonie des DPZ Göttingen genutzt.

Die speziellen Daten wie Tiernamen und -nummern, Geburtsdatum, Gewicht in Gramm und eventuell vorhandene Zuchterfahrung (Anzahl erfolgter Geburten) sind für jedes einzelne Tier aus Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tabelle 3.1: Daten der Weißbüschelaffen für den *in vivo*-Versuch

Tiername	Tiernummer	Geburtsdatum	Gewicht (g)	Zuchterfahrung/ Anzahl Geburten
Halla	W301	26.12.96	420	5
Sandra	W321	06.08.97	525	6
Valeska	W329	31.10.97	320	4
Desiree	W357	10.04.98	425	2
Eule	W358	22.03.98	470	2
Alicia	W368	28.04.98	460	4
Hispania	W371	22.05.98	360	4
Biggy	W415	18.02.98	550	0
Oskarline	W427	04.08.99	440	0
Opatja	W492	25.09.00	400	0

3.1.1.2 Versuchstiere für die *in situ*-Untersuchung von Zervix-Gewebe

Für die Gewinnung der Zervices für die histologischen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Versuche standen insgesamt 32 adulte weibliche Weißbüschelaffen der unter Punkt 3.1.1 beschriebenen Weißbüschelaffen-Kolonie zur Verfügung. Die Tiere hatten durchschnittliche Gewichte von 400g, waren zum Zeitpunkt der Organgewinnung in einem Alter von ca. 2-11 Jahren und wiesen unterschiedliche Zuchterfahrung auf (0-10 Geburten). Genaue Angaben zu den Tieren sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Es wurden drei Versuchsgruppen gebildet:

1)

Als Gewebe von anatomisch und physiologisch intakten, normal zyklischen Tieren wurden je 1 Zervix von einem Tier in der späten Follikelphase (sFP; W214: Tag 7 FP) und in der frühen sowie späten Lutealphase (fLP; W339: Tag 7 LP bzw. sLP; W215: Tag 13/14 LP) zum Vergleich mit den hormonbehandelten Tieren der weiteren Versuche eingesetzt.

2)

Für diesen Versuch wurden Zervices von intakten, nicht ovariectomierten weiblichen Weißbüschelaffen eingesetzt (W328, W336, W351, W357, W451, W487), denen vor einer Euthanasie durch Blutentzug während einer Saffan®-Injektionsanästhesie (Dosierung 0,15 ml/100 g i.m.; Mallinckrodt Veterinary Ltd., Großbritannien) lokal mittels Knopfkanüle 0,4 µg Relaxin an die Zervixportio verabreicht wurden. Die Einwirkzeit betrug ½ - 2 h (siehe Tab. 3.3).

3)

Die Tiere dieses Versuchs wurden zur Ausschaltung endogener Hormonquellen mindestens 3 ½ -4 Monate vor Versuchsbeginn ovariectomiert (n=23; siehe Tab. 3.2, gekennzeichnet mit OV). Dieser Versuch beinhaltete die systemische Behandlung der Tiere nach Ovariectomie mit Relaxin und/oder Östradiol. Es wurde eine Kontrollgruppe (Gruppe K) ohne jegliche Hormonbehandlung gebildet. Für die Hormonsubstitution wurde eine Gruppe von Tieren systemisch über 10 Tage mit 35 µg 17β-Östradiol (Gruppe E2) behandelt. Weiteren Tieren wurden für 3 Tage 2x täglich 100 µg rhRelaxin appliziert (Gruppe RLX). Die vierte Gruppe beinhaltete Tiere, die über 10 Tage mit 35 µg 17β-Östradiol und zusätzlich an den letzten 3 Tagen mit 2x täglich 100 µg rhRelaxin behandelt wurden (Gruppe E2+RLX). Die Einordnung der für diese Arbeit genutzten Tiere in die entsprechenden Gruppen ist Tabelle 3.4 zu entnehmen. Die Anzahl der für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen zur Verfügung stehenden Tiere wurde auf drei Tiere je Gruppe beschränkt. Für die molekularbiologischen Untersuchungen sind alle zur Verfügung stehenden Organe genutzt worden. Die Nutzung derselben Tiere für die histologischen und molekularbiologischen Methoden war aus technischen Gründen nicht in jedem Fall möglich (siehe Tab. 3.4).

Nach einer entsprechenden Euthanasie (siehe Versuch 2), wurden die Zervices gewonnen. Die Gewinnung der Organe für diesen Versuch erfolgte durch Frau Prof. Dr. Einspanier am DPZ. Sie wurden für die vorliegende Arbeit gesammelt und für die Untersuchungen zu Verfügung gestellt.

Die gewonnenen Organe aller Versuchsgruppen (1-3) wurden auf zwei verschiedene Weisen konserviert. Dafür wurden sie wenn möglich in 2 Teile geteilt. Ein Teil wurde zur Fixierung des Gewebes in 4%iges Formalin eingelegt und in Paraffin eingebettet. Der andere Organteil wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 3.2: Tierdaten der zur Organgewinnung für die histologischen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen herangezogenen Weißbüschelaffen

Tier-Nr.:	Name	Ovari- ektomie (OV)	Geburtsdatum	Euthanasie- datum	Zuchterfahrung/ Anzahl Geburten
W3	Volterra	OV	14.05.88	09.02.99	10
W21	Vroni	OV	04.08.89	15.12.99	1
W103	Raissa	OV	12.09.91	20.01.00	-
W157	Vreneli	OV	12.12.93	22.01.98	2
W159	Ortrud	OV	16.08.93	22.01.98	-
W184	Dolores	OV	05.05.94	22.01.98	-
W194	Käthe	OV	03.07.94	14.12.00	6
W207	Hermine	OV	13.03.94	10.04.01	1
W211	Vassilissa	OV	02.09.94	05.05.99	3
W213	Vecchia	OV	02.09.94	12.12.99	-
W214	Nymphe		30.10.94	07.10.99	-
W215	Vespa		21.06.94	04.05.01	2
W232	Vella	OV	31.05.94	01.12.98	-
W235	Dolly	OV	17.10.94	22.06.98	-
W241	Vinni	OV	30.04.95	09.02.99	-
W245	Lucy	OV	10.07.95	29.03.00	-
W252	Annabell	OV	26.11.95	22.06.98	-
W269	Paola	OV	26.01.96	19.05.00	4
W283	Devra	OV	29.07.96	01.12.98	-
W284	Alwine	OV	19.08.96	17.01.02	-
W300	Prinzessin	OV	19.01.97	14.05.02	2
W303	Hummel	OV	26.12.96	09.07.99	-
W322	Olivia	OV	31.08.97	15.08.01	-
W328	Tessa		23.08.97	12.03.03	6
W336	Gertrud		09.10.97	11.06.03	1
W339	Bibi		06.11.97	04.06.02	3
W351	Distl		11.02.98	11.06.03	6
W357	Desiree		10.04.98	01.10.02	2
W386	Okatvia	OV	04.08.98	18.12.01	-
W401	Liese	OV	05.11.98	14.05.00	-
W451	Valeria		10.11.99	20.03.03	2
W487	Fanny		20.02.99	03.04.03	2

OV: ovariektomierte Tiere zur Verwendung in Versuch 3 (Hormonsubstitution)

Tabelle 3.3: Einwirkzeit des lokal an die Zervix-Portio von intakten, weiblichen Weißbüschelaffen applizierten rekombinanten humanen Relaxins

Tiernummer	W351	W487	W328	W336	W451	W357
Einwirkdauer in h	½	½	1	1	1	2

Tabelle 3.4: Behandlungsregime für die einzelnen ovariectomierten Tiere, deren Einteilung in 4 Gruppen (K; E2; RLX; E2+RLX) und Verwendung für Histologie sowie Immunhistochemie (H) und/oder PCR (P); Applikation von 17 β -Östradiol bzw. rekombinantem humanen Relaxin (rhRLX)

Tier- Nummer	Keine Behandlung (Gruppe K)	35 μg 17β- Östradiol 1x pro Tag für 10d (Gruppe E2)	100 μg rhRLX 2x tägl. für 3d (Gruppe RLX)	35 μg 17β- Östradiol 1x pro Tag für 10d und 100μg rhRLX 2 x tägl. letzte 3d (Gruppe E2+RLX)
W21	(H)(P)			
W103	(H)(P)			
W245	(P)			
W303	(H)			
W184		(H)		
W241		(H)		
W283		(H)(P)		
W284		(P)		
W300		(P)		
W386		(P)		
W3			(H)	
W207			(P)	
W211			(P)	
W213			(H)(P)	
W252			(H)	
W322			(P)	
W401			(P)	
W157				(H)
W159				(P)
W194				(P)
W232				(P)
W235				(H)
W269				(H)(P)

3.1.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Hinweise zu den verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräten finden sich im Text zu den entsprechenden Methoden. Genauere Angaben zu Herstelleranleitungen oder Herstellungsfirmen sind durch einen Hinweis im Text gekennzeichnet und im Anhang aufgeführt.

3.2 Methoden

3.2.1 Kontrolle des reproduktiven Status der Tiere

Um den Zyklus zu kontrollieren und den aktuellen Reproduktionsstatus der weiblichen Tiere zu ermitteln, wurden regelmäßig Blutproben entnommen. Dies geschah an der Vena femoralis mittels einer 26G-Kanüle (B. Braun, Melsungen, Deutschland) und 1ml-Spritze (ERSTA; WDT, Garbsen, Deutschland). Es wurden routinemäßig während eines Zyklus zwei- bis dreimal im Abstand von ca. 10 Tagen 0,1-0,2 ml Blut pro Tier gewonnen. Mittels eines Enzymimmunoassays (HEISTERMANN et al. 1993) wurden die Progesteronwerte im Plasma bestimmt und der Zyklustatus daraus abgelesen. In der Follikelphase sind Progesteronwerte unter 10 ng/ml typisch (HEARN 1983). Um den Ovulationszeitpunkt, ungefähr am 10. Zyklustag, steigt der Plasmaprogesteronspiegel auf über 10 ng/ml an und erreicht Werte von über 100 ng/ml in der Lutealphase. Da die weiblichen Weißbüschelaffen keine äußeren Anzeichen für den Zyklusstand aufweisen, ist die Blutprogesteronbestimmung eine bewährte Methode, um den Zyklus zu kontrollieren (FRASER und LUNN 1999; HEARN 1983). Damit keine ungewollten Graviditäten entstehen, kann der Zyklus zwischen dem 10. und 15. Tag der Lutealphase mittels einer intramuskulären Gabe von 0,8 µg PGF_{2α} (Cloprostenol (Estrumate®), essex pharma GmbH, München, Deutschland) abgebrochen werden (EINSPANIER et al. 1999; SUMMERS et al. 1985). Dadurch kommt es zur Luteolyse und der Plasmaprogesteronspiegel sinkt wieder auf Werte unter 10 ng/ml. Der Tag der PGF_{2α}-Injektion wird als Tag 0 des folgenden Zyklus festgelegt. 3-4 Tage nach der Injektion wird der Abfall des Progesteronwertes kontrolliert.

3.2.2 Messung des Zervix-Innendurchmessers *in vivo*

Für diesen Versuch wurden die unter Punkt 3.1.1.1 aufgeführten Weißbüschelaffen (n=10) genutzt (siehe Tab. 3.5).

Weiterhin benötigtes Material waren 12 aus gebürstetem Edelstahl bestehende Messröhrchen (Sonderanfertigung der Firma Dostal-Maschinenbau, Schlitz, Deutschland) mit unterschiedlichen Außendurchmessern und einer Nummerierung von 1-12 (siehe Tabelle 3.6).

Die ca. 12 h nüchtern gelassenen Tiere wurden durch eine intramuskuläre Injektion von Saffan® (Mallinckrodt) mit der Dosierung von 0,15 ml/100 g Körpergewicht anästhesiert und auf einer zum Kopf des Tieres abschüssigen Unterlage gelagert. Ein Ausbinden des Tieres war nicht notwendig. Die Vulva wurde mit Jodlösung (Braunol®, Polyvinylpyrrolidon-Jod-Komplex, B. Braun) gereinigt. Unter leichtem Spreizen der Schamlippen des Tieres wurde das Messröhrchen mit dem geringsten Durchmesser (Röhrchen-Nr. 12, Tab. 3.6) eingeführt. Nach Entfernen dieses Röhrchens wurde das mit dem nächst größeren Durchmesser verwendet usw. Sobald ein Röhrchen nicht mehr eingeführt werden konnte, wurde der Messvorgang abgebrochen und die maximal mögliche Röhrchengröße als Ausgangswert notiert. Es wurden mehrere Messungen pro Tier durchgeführt (siehe Tab. 3.5). Bei einigen Versuchen wurden nach der ersten Messung 0,4 µg rhRLX lokal mit einer Knopfkanüle an die Zervix-Portio appliziert (siehe Tab. 3.5, Spalte „RLX“ gekennzeichnet mit „+“). Nach

30 min Einwirkzeit wurde der Messvorgang wie oben beschriebenen wiederholt und der Wert ebenfalls notiert.

Nach Beendigung des jeweiligen Versuches wurden die Tiere in eine Aufwachbox gelegt und mit Rotlicht gegen eine eventuelle Unterkühlung bestrahlt. Nach vollständigem Aufwachen wurden sie zurück zu ihren Partnern gesetzt.

Alle verwendeten Geräte wurden nach jedem Versuch gereinigt und autoklaviert (Autoklav Typ 117-2 der Firma KSG, Olching, Deutschland).

Tabelle 3.5: Anzahl und Datum der Versuche für jedes Tier; Durchführung einer zweiten Messung nach Relaxin-Applikation: Spalte „RLX“: + = Relaxin-Gabe; - = keine Relaxin-Gabe

Tier-Nr.	Anzahl der Versuche	Versuchs-Datum	RLX	Tier-Nr.	Anzahl der Versuche	Versuchs-Datum	RLX
W301	1.	07.09.02	+	W368	1.	06.08.02	-
	2.	24.10.02	+		2.	22.09.02	-
	3.	06.12.02	+		3.	08.11.02	+
					4.	20.01.03	+
W321	1.	07.09.02	-				
	2.	25.10.02	-	W371	1.	30.09.02	-
	3.	12.12.02	-		2.	18.11.02	-
	4.	27.02.03	+		3.	13.02.03	+
W329	1.	20.09.02	-	W415	1.	17.02.03	+
	2.	08.11.02	-				
	3.	16.01.03	+	W427	1.	09.09.02	-
					2.	24.10.02	-
W357	1.	13.03.02	+		3.	06.12.02	+
	2.	15.08.02	+				
	3.	01.10.02	+	W492	1.	30.09.02	-
					2.	18.11.02	-
W358	1.	31.10.02	+		3.	07.02.03	+
	2.	16.12.02	+				
	3.	24.01.03	+				

Tabelle 3.6: Größe und Nummerierung der Messröhrchen

Messröhrchen- Nummer	Außendurchmesser in mm	Messröhrchen- Nummer	Außendurchmesser in mm
12	1,00 (+/- 0,10-0,20 mm)	6	7,00 (+/- 0,10-0,20 mm)
11	2,00 (+/- 0,10-0,20 mm)	5	8,00 (+/- 0,10-0,20 mm)
10	3,00 (+/- 0,10-0,20 mm)	4	9,00 (+/- 0,10-0,20 mm)
9	4,00 (+/- 0,10-0,20 mm)	3	10,00 (+/- 0,10-0,20 mm)
8	5,00 (+/- 0,10-0,20 mm)	2	11,00 (+/- 0,10-0,20 mm)
7	6,00 (+/- 0,10-0,20 mm)	1	12,00 (+/- 0,10-0,20 mm)

3.2.3 Untersuchung der Organe

3.2.3.1 Bestimmung der Zervix-Nassgewichte

Die nach der Euthanasie (siehe Punkt 3.1.1.2) frisch entnommenen Organe der ovariectomierten und systemisch hormonbehandelten Tiere (Versuch 3, siehe Punkt 3.1.1.2) wurden sofort präpariert und im Ganzen gewogen. Das Gewicht wurde in Gramm bestimmt.

3.2.3.2 Anfertigen von Präparaten für die Histologie und Immunhistochemie

Die Organe (Zervices) der unter Punkt 3.1.1.2 genannten Weißbüschelaffen wurden sofort nach der Entnahme bzw. nach der Bestimmung der Zervix-Nassgewichte (siehe Punkt 3.2.3.1) in 4%iges Formalin eingelegt, das je nach Größe der Organe ca. 12 h einwirken konnte. Danach wurden sie vollständig entwässert und in Paraffin eingebettet.

Nach vollkommener Aushärtung des Paraffins wurden die Organe mit einem Mikrotom (Typ HM 36 der Firma Microm GmbH, Walldorf, Deutschland) auf 5 µm Dicke geschnitten und auf mit 0.01%igem Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Sternheim, Deutschland) beschichtete Objektträger (Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe, Deutschland) aufgezogen.

Diese Präparate standen dann für die histologischen und immunhistochemischen Färbemethoden zur Verfügung.

3.2.3.3 Histologie

3.2.3.3.1 Übersichtsfärbung mit Hämalan und Eosin

Die Hämalan-Eosin(H&E)-Färbung wurde zur vergleichenden Betrachtung der Morphologie der verschiedenen Zervices angefertigt.

Die wie unter Punkt 3.2.3.2 angefertigten Präparate wurden über Nacht in einem Trockenschrank (Typ 2028 der Firma Heraeus, Deutschland) auf 37°C angewärmt und am nächsten Tag entparaffiniert.

Dazu wurden die Objektträger für 2 x 15 min in Xylol (>98% Xylene für Histologie; Roth) und 2 x 5 min in 100%iges Ethanol (Bundesmonopolverwaltung, Leipzig) getaucht. Danach wurde der Wassergehalt durch jeweils 3-minütiges Verweilen in 90/80/70/50%igem Ethanol

(absteigende Ethanolreihe) schrittweise erhöht und die Objektträger anschließend für 5 min in Aqua bidest eingetaucht.

Zum Anfärben der Zellkerne wurden die Objektträger für 2 min in eine Küvette (Roth) mit Hämalaun-Lösung nach Mayer (gebrauchsfertig; Merck KGaA, Darmstadt, Karlsruhe) verbracht und nach kurzem Spülen in Aqua bidest für 10 min unter schwach fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend kamen die Präparate für 3 min in eine Eosin-Lösung (Eosin: Merck KGaA Darmstadt, Deutschland; Zusammensetzung der Lösung siehe Anhang) zur Färbung des Zytoplasmas und wurden danach wiederum in Aqua bidest gespült.

Das in den Präparaten enthaltene Wasser wurde in der darauf folgenden aufsteigenden Ethanolreihe (30 sec. 70%, 1 min 90%, 2 x 5 min 100% Ethanol) wieder entfernt.

Nach 2 x 5-minütigem Verweilen in Xylol wurden die gefärbten Präparate mittels DPX-Mountant for histology (Firma Fluka BioChemika, Buch, Schweiz) mit einem Deckgläschen (Roth) eingedeckt und konnten nach vollständiger Trocknung unter dem Mikroskop (Axioskop 2 mot plus, Zeiss, Jena, Deutschland) betrachtet werden.

3.2.3.3.2 Eosinophilenfärbung mit Siriusrot

Um die eosinophilen Granulozyten spezifisch anzufärben, wurde die Siriusrot-Färbung durchgeführt. Dabei werden die Zellkerne dunkelviolett und das Zytoplasma mit den Granula leuchtend rot angefärbt (REIBIGER u. SPANEL-BOROWSKI 2000).

Die Entparaffinierung der Schnitte von den ovariektomierten und systemisch hormon-behandelten Tieren (Versuch 3 siehe Punkt 3.1.1.2 „Material zur Untersuchung von Zervixgewebe“) erfolgte wie unter Punkt 3.2.3.3.1 „Übersichtsfärbung mit Hämalaun und Eosin“ beschrieben, einschließlich der Überführung in Aqua bidest für 5 min. Dann wurden die Objektträger für 15-20 sec in Hämalaun nach Mayer getaucht und anschließend 2 min in fließendem Leitungswasser gebläut. Danach wurden sie für 1 min in 70%iges Ethanol verbracht und anschließend für 5 h in der Siriusrot-Lösung gefärbt (Siriusrot F3B, DyStar Textilfarben GmbH & Co., Frankfurt, Deutschland; Zusammensetzung der Lösung siehe Anhang).

Nach Ablauf der Färbezeit in der Siriusrot-Lösung wurden die Objektträger wie in Punkt 3.2.3.1 in der aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol vollständig entwässert und mit DPX eingedeckt. Die Färbung der Präparate wurde im Institut für Anatomie der Universität Leipzig in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Spanel-Borowski durchgeführt.

Anschließend konnten die Zellen von mir unter dem Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss) betrachtet und bei 400facher Vergrößerung in 8 zufällig ausgewählten, alle Gewebeschichten abdeckenden Gesichtsfeldern pro Schnitt ausgezählt werden, um die durchschnittliche Zellzahl pro Sichtfeld zu bestimmen.

3.2.3.3.3 Trichrom-Färbung nach Masson

Die Masson-Trichrom-Färbung ist eine übliche Methode zur Darstellung der kollagenen Fasern der Extrazellulären Matrix des Bindegewebes (ROMEIS 1989).

Die Entparaffinierung sowie die auf die Färbung folgende Entwässerung und das Eindecken der Objektträger erfolgten wie bei der H&E-Färbung unter Punkt 3.2.3.3.1 beschrieben.

Für den Färbeporgang an sich wurden ein Masson-Trichrom-Färb-Set und Weigert's Eisenhämatoxylin der Firma Sigma-Aldrich verwendet und die Färbung nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Objektträger wurden nach Entnahme aus dem Aqua bidest zur Anfärbung der Zellkerne für 5 min in Weigerts Eisenhämatoxylin-Arbeitslösung (siehe Anhang) verbracht. Anschließend wurde die Färbung wiederum für 5 min in fließendem Leitungswasser stabilisiert. Nach kurzer Spülung in Aqua bidest wurden die Objektträger für 5 min in Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin gestellt, um das Zytoplasma rot anzufärben. Daraufhin wurde wieder kurz in Aqua bidest gespült und die Schnitte wurden für 8 min in Phosphomolybdän-Arbeitslösung (siehe Anhang) verbracht. Aus der Lösung wurden die Schnitte ohne Spülvorgang direkt für 5 min in die Anilin-Blau-Lösung zur Darstellung der Kollagenfasern überführt. Anschließend wurde wieder kurz mit Aqua bidest gespült und die Objektträger danach für 1,5 min in 1%ige Essigsäure eingetaucht.

Dann erfolgten Entwässerung und Eindecken der Objektträger mit DPX.

3.2.3.3.4 Färbung mit Pikrosiriusrot

Die Pikrosiriusrot-Färbung ist eine weitere Färbung, die spezifisch ist für die Darstellung der Kollagenfasern in der Extrazellulären Matrix (DU et al. 2003). Sie wurde angefertigt, um die Daten aus der Masson-Trichrom-Färbung zu verifizieren.

Die Vorbereitung und Entparaffinierung bzw. die Entwässerung und das Eindecken wurden wie schon bekannt (Punkt 3.2.3.3.1) durchgeführt.

Der eigentliche Färbeporgang begann mit der Kernfärbung mittels Weigert's Eisenhämatoxylin-Arbeitslösung (siehe Anhang) für 9 min. Danach wurde in fließendem Leitungswasser für 5 min gespült. Nach kurzer Spülung in Aqua bidest wurden die Schnitte für 30 min in die Pikrosiriusrot-Lösung (siehe Anhang) verbracht. Daraufhin wurde wieder kurz in Aqua bidest gespült und anschließend wurden die Objektträger für 4 min in verdünnte Essigsäure (siehe Anhang) getaucht, wobei die gesamte Lösung zur besseren Einwirkung nach 2 min einmal vollständig gewechselt wurde.

Nach erneuter Spülung in Aqua bidest wurden die Schnitte entwässert und mit DPX eingedeckt.

3.2.3.4 Immunhistochemie zur Darstellung von Proteinen im Zervixgewebe (Hormonrezeptoren, Relaxin, Kollagenasen, Blutgefäße)

Für die folgenden Untersuchungen wurde die Methode der indirekten Immunhistochemie angewendet. Bei dieser Technik wird die nachzuweisende Protein-Struktur mit einem spezifischen, unkonjugierten Primärantikörper markiert. An diesen Antikörper bindet im nächsten Schritt ein für die jeweilige Tierart des Primärantikörpers spezifischer Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper ist mit einem Markerenzym (z.B. Peroxidase)

markiert. Gibt man nun das entsprechende Substrat dazu, wird dieses vom Enzym während einer sichtbaren Farbreaktion umgesetzt (NOLL u. SCHAUB-KUHNEN 2000).

Es wurden verschiedene Primärantikörper (siehe Tabelle 3.7) sowie Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-Peroxidase/HRP) - konjugierte Sekundärantikörper (goat-anti-mouse/anti-rabbit-Antikörper, DAKO EnVision™ detection kit, Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland) eingesetzt.

Als chromogenes Substrat kam der AEC(3-Amino-9-Ethylcarbazol)-Peroxidase-Substrat-Kit (Vector Laboratories, Burlingame, Kanada) zum Einsatz, der zu einer rotbraunen Färbung führt. Die Substratlösung wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt (siehe Anhang). Als Waschpuffer wurde PBS-Puffer verwendet (Phosphat buffered Saline, gebrauchsfertig; Biochrom KG, Berlin, Deutschland).

3.2.3.4.1 Vorbehandlung

Die Verwendung bestimmter Antikörper, die in Tabelle 3.7 mit einem „+“ gekennzeichnet sind, erforderte eine vorausgehende enzymatische Demaskierung zur besseren Identifizierung der darzustellenden Substanzen (NOLL und SCHAUB-KUHNEN 2000).

Alle Präparate wurden wie für die Histologie auch für diese Methode über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank (Heraeus) vorgewärmt.

Die Vorbehandlung, die nach der Entparaffinierung (siehe Punkt 3.2.3.3.1) erfolgte, erforderte folgende Schritte: nachdem die Präparate nach dem Entparaffinieren 5 min in Aqua bidest gespült wurden, wurden sie in eine auf 120°C vorgewärmte Küvette mit Zitratpuffer (siehe Anhang) im Wärmeschrank (Heraeus) verbracht. Darin verblieben sie für 10 min weiterhin bei 120°C und kühlten danach für c.a. 30 min bei Raumtemperatur ab. Nach kurzer Spülung mit Aqua bidest kamen die Schnitte in eine Küvette mit 0,0125%iger Trypsinlösung (GIBCO BRL Life Technology; Paisley, Scotland), welche im Wärmeschrank auf 37°C angewärmt wurde und der kurz vor Gebrauch 0,03 g CaCl₂ (Sigma-Aldrich) zugesetzt wurden. In dieser Lösung verblieben die Schnitte für 8 min wiederum im Wärmeschrank. An diese Vorbehandlung schloss dann der eigentliche Färbevorgang (Punkt 3.2.4.2) an, der identisch ist für die Färbungen mit und ohne Vorbehandlung.

3.2.3.4.2 Durchführung der immunhistoschemischen Färbungen

Direkt anschließend an das Entparaffinieren oder nach Vorbehandlung (siehe Punkt 3.2.3.4.1) wurden die Präparate für 2 x 5 min in PBS-Puffer gespült. Danach wurden sie in einer feuchten Kammer für 20 min bei Raumtemperatur mit jeweils 1 Tropfen 3%igem H₂O₂ (Roth) inkubiert. Anschließend wurde wiederum für 2 x 5 min mit PBS-Puffer gespült. Dann wurde für 30 min humanes Normalserum in der Verdünnung 1:100 (verdünnt mit Aqua bidest) aufgetragen. Das Normalserum wird eingesetzt, weil es i.d.R. keine gegen die zu untersuchende Struktur gerichteten Antikörper enthält, da es von nicht spezifisch immunisierten Individuen stammt. Es wird angewendet, um elektrostatische Ladungen der Proteine im Gewebeschnitt abzusättigen und somit eine unspezifische Färbung (Hintergrundfärbung) zu verhindern (NOLL und SCHAUB-KUHNEN 2000).

Nach Einwirkung des Normalserums wurden ohne zwischengeschalteten PBS-Spülvorgang die Primär-Antikörper aufgetragen. Diese Antikörper wurden für die jeweilige Färbung

speziell ausgewählt und sind in Tabelle 3.7 genauer charakterisiert. Die gewählten Verdünnungen wurden in für jeden Antikörper eigens durchgeführten Verdünnungsreihen ermittelt. Für die Negativkontrolle wurde eine in der Spezifität und Konzentration dem spezifischen Antikörper entsprechende IgG-Lösung verwendet. Die Antikörper konnten ca. 24 h über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer auf die Präparate einwirken.

Am nächsten Tag wurde zuerst wieder mit PBS-Puffer für 2 x 5 min gewaschen. Danach wurden die HRP-konjugierten Sekundär-Antikörper (Dako) für 40-45 min aufgetragen. Bevor das chromogene Substrat AEC (Vector) für 10 min aufgetragen wurde, wurde noch einmal mit PBS-Puffer für 2 x 5 min gespült.

Zum Stoppen der Enzym-Substrat-Reaktion wurden die Schnitte dann für 5 min in Leitungswasser getaucht und danach kurz mit Aqua bidest gespült. Abschließend wurden sie in der wässrigen Phase mit Immu-Mount (Shandon, Pittsburg, USA) eingedeckt. Frühestens 4 h danach konnten sie gegen Austrocknen mit Neo-Mount (Merck) abgedichtet werden.

Tabelle 3.7: Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Vor- behandlung	Verdünnung	Art des Ak	Herkunft des Ak
ER α	+	1:100	monoclonal mouse- anti-human-IgG	Euromedex Frankreich
PR	+	1:100	monoclonal mouse-IgG	Immunotech Hamburg
17 β -HSD7	-	1:1000	Kaninchen-IgG (Auftragsherstellung)	Pineda Berlin
LGR7	-	1:1000	Kaninchen-IgG (Auftragsherstellung)	Pineda Berlin
RLX	-	1:5000	polyclonal rabbit-anti-porcine	Prof. Sherwood USA
Aktin	-	1:500	monoclonal mouse-IgG	Immunotech Hamburg
MMP-1	+	1:5	polyclonal goat-anti- human-IgG	Santa Cruz Heidelberg
MMP-2	+	1:5	polyclonal goat-anti- human-IgG	Santa Cruz Heidelberg
MMP-9	+	1:200	rabbit-anti-human/ anti-guinea pig	Microm Walldorf

ER α : Östradiolrezeptor α , PR: Progesteronrezeptor, 17 β HSD7: 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, LGR7: Relaxinrezeptor, RLX: Relaxin, MMP: Matrix-Metalloproteinase; Durchführung der Färbung mit(+)/ohne(-) Vorbehandlung; angewendete Verdünnung; genauere Angaben zu den Antikörper-Herstellern finden sich im Anhang.

Bei den Färbungen zur Darstellung der MMP-1, -2 und -9 wurden die Zellkerne in den Präparaten durch kurzes Eintauchen in Hämalaun nach Meyer nach dem Stoppen der Enzym-Substrat-Reaktion und vor dem Eindecken gegengefärbt. Diese zusätzliche Kernfärbung dient zur besseren Differenzierung einer positiven Reaktion der Zellen.

Die Färbung mit Aktin erfolgte zur Darstellung der Blutgefäße im Zervixgewebe, da diese Struktur nicht nur in glatten Muskelzellen vorkommt, sondern auch Bestandteil des Gefäßendothels ist (LEONHARDT 1990). Die somit sichtbar gemachten Gefäße konnten unter dem Lichtmikroskop in 8 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern in allen Gewebeschichten bei 200facher Vergrößerung ausgezählt werden, um die durchschnittliche Gefäßanzahl pro Sichtfeld zu bestimmen.

3.2.3.5 Molekularbiologie

Um die immunhistochemischen Ergebnisse zu ergänzen, wurde die Methode der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zum Nachweis der Expression der Östradiol-, Progesteron- und Relaxinrezeptoren, des Relaxins und des VEGF auf Transkript-Ebene im Zervixgewebe angewendet. Hierzu ist die Isolation der RNA aus dem zu untersuchenden Gewebe notwendig. Diese wird durch Reverse Transkription in Erststrang-cDNA umgeschrieben, die dann zur PCR eingesetzt werden kann.

3.2.3.5.1 RNA-Präparation

Zur Durchführung der RT-PCR wurde Gesamt-RNA aus dem verwendeten Organmaterial isoliert. Hierfür sind eine Zerkleinerung des Gewebes sowie eine Zerstörung der Zellen notwendig. Um eine möglichst schnelle Lyse des Gewebematerials zu ermöglichen, ist der Einsatz von kleineren Gewebestücken von Vorteil. Deshalb wurden die bei - 80°C tiefgefrorenen Organteile mit einem Kryostaten (Modell 1720 Firma Leitz, Deutschland) in 30 µm Schichtdicke geschnitten und bis zur weiteren Verwendung bei - 80°C gelagert.

Die RNA-Präparation erfolgt mit Hilfe des RNeasy-Midi-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland). Das wie oben vorbereitete Organmaterial wurde nach Angaben des Herstellers mit RLT-Puffer zur Denaturierung von Proteinen und Inaktivierung gewebseigener RNasen sowie mit β-Merkaptoethanol zum Aufbrechen intramolekularer Disulfidbrücken versetzt. Durch wiederholtes Aufziehen der Lösung durch eine 20G-Kanüle (B. Braun) in eine 2 ml-Spritze (B. Braun) wurde das Material bis zum Entstehen einer klaren Lösung lysiert und homogenisiert und danach auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 10°C und 5000 rpm zentrifugiert, um nicht lysierte Zelltrümmer abzutrennen (Zentrifuge Universal 30 RF, Rettberg Laborgeräte, Göttingen, Deutschland). Das Lysat wurde durch eine Säule zentrifugiert, die eine Silica-Gel-Membran enthält. An dieser Membran können RNA-Fragmente ab einer Größe von 200 Nukleotiden gebunden werden. Der Durchlauf wurde nach dem Zentrifugieren verworfen. Es folgten als weitere Schritte das Waschen der Membran mit Puffer RW-1 und die Fällung der RNA mit Puffer RPE. Die an die Membran gebundene RNA wurde mit 150 µl RNase/DNase-freiem Wasser eluiert. Zum Schutz der isolierten RNA wurde das Eluat mit jeweils 3 µl RNasin (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) versetzt. Die gewonnene Gesamt-RNA konnte daraufhin zur cDNA-Synthese eingesetzt werden.

3.2.3.5.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zum Nachweis von mRNA im Zervixgewebe (Hormonrezeptoren, Relaxin, VEGF)

3.2.3.5.2.1 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA mittels reverser Transkription

Für die Erststrang-cDNA-Synthese nutzt man die Fähigkeit des Enzyms Reverse Transkriptase, bei Vorhandensein freier Desoxynukleotidphosphate (dNTP: dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und entsprechender Primer, vorliegende mRNA in komplementäre DNA umzuschreiben. Für die Erststrangsynthese wurde der Oligonukleotid-Primer Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet, der an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindet.

Um sicher zu gehen, dass das zur cDNA-Synthese eingesetzte Material frei von genomischen DNA-Resten ist, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Um eine möglichst einheitliche Menge an RNA dafür einzusetzen, wurde die optische Dichte der gewonnenen RNA-Lösungen photometrisch bestimmt. Daraus wurden die notwendigen Volumina bestimmt, in denen jeweils 1-2 µg RNA vorhanden waren. Diese wurden mit RNase/DNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 7,5 µl ergänzt, dann mit jeweils 2,5 µl DNase-Reagenz (1 µl RQ1-DNase, 1 µl RQ1-Puffer, 0,5 µl RNasin (RNase-Inhibitor); Promega) versetzt, der Ansatz gemischt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde je 1 µl STOP-Reagenz (Promega) zugesetzt, gemischt und bei 65°C für 10 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze auf Eis gekühlt.

Nach dem DNase-Verdau wurden 8 µl des Ansatzes mit 1 µl Primer (Oligo(dT)₁₂₋₁₈) und 1 µl dNTP-Mix (Roth) versetzt, gemischt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für mindestens 1 min auf Eis gekühlt.

Danach wurden pro Ansatz 10 µl cDNA-Synthese-Mix (2 µl 10x RT-Puffer, 4 µl 25mM MgCl₂, 2 µl 0,1M DTT, 1 µl RNase out und 1 µl SuperScript III; Invitrogen) zugegeben und für 50 min bei 50°C inkubiert, so dass die reverse Transkription stattfinden konnte. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Reverse Transkriptase (SuperScript III) durch eine 5-minütige Erhöhung der Temperatur auf 85°C denaturiert. Nach kurzer Abkühlung im Eisbad wurde jeweils 1 µl RNase H zugegeben und für 20 min bei 37°C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Material bei -20°C gelagert.

3.2.3.5.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich, die nachzuweisenden DNA-Sequenzen in einer Lösung zu vervielfältigen. Hierzu werden vom Primerpaar (forward und reverse) eingeschlossene DNA-Sequenzen amplifiziert.

Vor der Durchführung der molekularbiologischen Nachweise wurde zur Überprüfung der erfolgreichen cDNA-Synthese eine PCR zum Nachweis des „house-keeping“-Gens 18S-rRNA (Primer siehe Tabelle 3.9) durchgeführt. Hierzu wurde von jedem cDNA-Ansatz ein gleiches Volumen von 1 µl eingesetzt.

Die cDNA-Proben wurden auf Eis aufgetaut. Aus den in Tabelle 3.8 aufgeführten, bei -20°C gelagerten Agenzien wurde der PCR-Mix (HotStarTaq-Polymerase) hergestellt.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung der PCR-Reagenzien für die Taq- und Pfu- und HotStarTaq-Polymerase (beispielhaft für 1 µl eingesetztes Template; Gesamtvolumen 25 µl)

Polymerase Substanz (µl)	Taq (ERα, PR, LGR7, RLX)	Pfu (VEGF)	HotStarTaq (18S-rRNA)
RNase/DNase-freies H ₂ O	18,95	19,5	19,7
10x NH ₄ -Puffer	2,5	2,5	2,5
50mM MgCl ₂	0,75	im Puffer enthalten	im Puffer enthalten
10mM dNTP (dATP/dGTP/dCTP/dTTP)	0,5	0,5	0,5
Primer for (forward) 100 pmol/µl	0,5	0,5	0,5
Primer rev (reverse) 100 pmol/µl	0,5	0,5	0,5
Polymerase	0,3	0,5	0,3

Bezugsquellen für die verwendeten Reagenzien: 10x NH₄-Puffer, 50mM MgCl₂, Taq-Polymerase: Invitex GmbH, Berlin, Deutschland; Pfu-Polymerase: Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland; HotStarTaq-Polymerase: Qiagen, Hilden, Deutschland; dNTP: Roth; Primer for, Primer rev: MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

Dann wurde jeweils 1 µl Template zugegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 25 µl vorlag. Die Lösung wurde gemischt, kurz anzentrifugiert und dann in den Thermocycler (Mastercycler gradient, Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gestellt.

Die PCR durchlief 35 identische Zyklen:

- 1) Initiale Denaturierung für 15 min (HotStarTaq-Polymerase) bzw. 4 min (Taq- und Pfu-Polymerase) bei 94°C.
 - 2) Denaturierung für 30 sec bei 94°C.
 - 3) Annealing für 30 sec bei 60°C. Dieser Reaktionsschritt ist notwendig, damit die spezifischen, komplementären Primer an die entsprechende Einzelstrang-DNA binden können und somit ein Ansatzpunkt für die Polymerase in Form einer freien OH-Gruppe am 3'-Ende des Primers entsteht. Bei der Taq- und Pfu-Polymerase wurde die Temperatur von anfangs 65°C mit jedem durchlaufenen Zyklus um 1°C gesenkt, bis eine Temperatur von 55°C erreicht war, bei der die weiteren Zyklen bis zum Ende der Kettenreaktion abliefen.
 - 4) Elongation der Doppelstränge für 30 sec (bei Pfu-Polymerase 1 min) bei 72°C. Diese Temperatur stellt das Reaktionsoptimum der Polymerase dar.
- An diese Reaktion anschließend startete jeweils ein neuer Zyklus mit der Denaturierung (Schritt 2) von vorn (Kettenreaktion).

Nach Durchlaufen aller 35 Zyklen erfolgte eine abschließende Elongation für 4 min bei 72°C. Nach Ablauf der gesamten PCR wurde die Temperatur im PCR-Block auf 4°C gesenkt.

Die in der 18S-PCR erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Punkt 3.2.2.5.4) getrennt, im Geldokumentationssystem GeneGenius 2 (Syngene, Frederick, MD, USA) sichtbar gemacht und mit dem Programm Gene Tools quantifiziert. Nach der Quantifizierung wurde für jede Probe die für die nachfolgenden PCRs einzusetzende Template-Menge bestimmt.

Die weiteren PCRs (ER α , PR, RLX, LGR7, VEGF; Primer siehe Tabelle 3.9) wurden nach dem Schema der 18S-PCR durchgeführt. Für den Nachweis des VEGF wurde die Pfu-Polymerase und für die weiteren PCRs die Taq-Polymerase eingesetzt (siehe Tab. 3.8). Die eingesetzten, unterschiedlichen Mengen an cDNA, die aus der Quantifizierung der 18S-PCR bestimmt wurden, wurden durch Erhöhung bzw. Verringerung der Menge des zugegebenen RNase/DNase-freien Wassers ausgeglichen, so dass für alle Proben ein einheitliches Gesamtvolumen von 25 μ l für die PCR zur Verfügung stand.

Tabelle 3.9: Sequenzen der eingesetzten Primer

Primer	Sequenz (von 5' nach 3')
18S rRNA	18Sfor: GAG AAA CGG CTA CCA CAT CCA A 18Srev: GAC ACT CAG CTA AGA GCA TCG A
ER α	hera268for: ATG ACC ATG ACC CTC CAC AC hera268rev: CGG AGA CAC GCT GTT GAG T
PR	hPRABfor: GGT CTA CCC GCC CTA TCT CA hPRABrev: GGC TTG GCT TTC ATT TGG AA
RLX	RLXfor: ACA AAC GGG AAG GAC GAC G RLXrev: CGA GAA TGA GCA TGC AAG CC
VEGF	hVEGFfor: TTG CTG CTC TAC CTC CAC CA hVEGFrev: TTA CAC GCT TGC GGA TCT TG
LGR7	RLXR1for: GCT TCC TCC TGA TTG CTT CA RLXR1rev: TCA GGT AAA CGG GTG AGG AC

ER α = Östradiolrezeptor α ; PR = Progesteronrezeptor; RLX = Relaxin; VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor; LGR7 = Relaxinrezeptor 1

3.2.3.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis der PCR-Produkte wurde die Agarose-Gelelektrophorese genutzt, bei der die Fragmente im Gel durch Anlegen einer elektrischen Spannung nach der Größe aufgetrennt werden. Es wurde ein 1,5%iges Agarosegel hergestellt, dem zur späteren Visualisierung der DNA-Banden im UV-Licht Ethidiumbromid zugesetzt wurde (siehe Anhang). Die aufgekochte Lösung wurde in eine Elektrophorese-Kammer (Midi-Kammer; Roth) gegossen und Taschenkämme wurden eingesetzt, um nach Polymerisierung des Gels befüllbare Taschen zu erhalten. In diese Taschen wurden jeweils 10 μ l PCR-Produkt mit je 2 μ l 6x Loading Dye Solution (Fermentas) bzw. 10 μ l Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Fermentas) als Längen-Standard aufgetragen. Dann wurde die Midi-Kammer mit TBE-Puffer (siehe Anhang) befüllt und die DNA-Fragmente wurden im Gel bei 75 Volt und 45 mA aufgetrennt.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele im Geldokumentationssystem (GeneGenius 2, Syngene) fotografiert und anschließend ausgewertet.

3.3 Auswertung

Für die Berechnung von Mittelwerten (MW) und Standardabweichungen (SD) wurde das Programm Microsoft Excel verwendet. Die Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes SigmaStat2.0 (JANDEL) bestimmt. Als normalverteilt gelten Werte mit $p > 0,05$. Der SEM wurde bei der Ermittlung der Siriusrot-positiv gefärbten Zellen pro Sichtfeld aufgrund stark streuender Einzelwerte verwendet und nach der Formel $SEM = SD / \sqrt{n}$ berechnet (n =Anzahl der Werte, aus denen die SD gebildet wurde). Zur Ermittlung der Signifikanzen wurden der Student-t-test bzw. bei nicht normalverteilten Werten der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test (Microsoft Excel / Sigma Stat) genutzt. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit $p < 0,05$ gewertet.

Die Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Präparate erfolgte durch lichtmikroskopische Betrachtung (Axioskop 2 mot plus, Zeiss). Die Bewertung der Expression der jeweils zu untersuchenden Struktur erfolgte auf der Basis von positiven (gefärbten) und negativen (ungefärbten) Zellen. Die Färbeintensität wurde nicht in die Auswertung einbezogen. Die Dokumentation der Präparate erfolgte mittels digitaler Bildaufnahme (AxioCam MRc, Zeiss, Jena) und der Software Axiovision 4 (Zeiss). Für die Auszählung der eosinophilen Granulozyten (siehe Punkt 3.2.3.3.2) wurden pro Schnitt 8 zufällig ausgewählte Sichtfelder, die alle Gewebeschichten beinhalteten, bei 400facher Vergrößerung herangezogen. Zum Auszählen der Blutgefäße in den mit Aktin untersuchten Schnitten (siehe Punkt 3.2.3.4.2) wurden ebenfalls 8 zufällig ausgewählte Sichtfelder im gesamten Präparat bei 200facher Vergrößerung ausgewertet. Das Zählen wurde zweimal durchgeführt und erfolgte zusätzlich von einer weiteren, unabhängigen Person. Aus den jeweils ermittelten Ergebnissen wurde der Mittelwert gebildet.

Für die Dokumentation der molekularbiologischen Versuche wurde das Geldokumentationssystem Gene Genius 2 (Syngene, Frederick, MD, USA) genutzt.

Für die Bildbearbeitung wurden die Programme Adobe Photoshop bzw. Power Point verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung des Zervix-Innendurchmessers *in vivo*

Die Messung des Zervix-Innendurchmessers erfolgte mittels spezieller Messröhrchen unter Allgemeinanästhesie (siehe Material und Methoden, Abschnitt 3.2.2). Die Bestimmung des Zervix-Innendurchmessers ergab die in Tabelle 4.1 aufgeführten Ergebnisse. Zur Bestimmung von Ausgangswerten ohne Relaxinapplikation wurden bei den 10 zur Verfügung stehenden Tieren insgesamt 30 Messungen durchgeführt. Die Anzahl der Messungen pro Tier lässt sich aus Tabelle 4.1 entnehmen. Der ermittelte Innendurchmesser der Zervix betrug durchschnittlich $4,75 \pm 1,14$ mm. Die Ausgangsmesswerte wurden in Gruppen von Tieren mit bzw. ohne Zuchterfahrung (bereits erfolgte Geburten bzw. keine Geburten) eingeteilt. Für die Tiere mit Zuchterfahrung (2-6 Geburten; Gesamtanzahl der Messungen $n=23$) ergab sich ein durchschnittlicher Wert von $5,0 \pm 1,2$ mm und für die Tiere ohne Zuchterfahrung (Gesamtanzahl der Messungen $n=7$) ein durchschnittlicher Zervix-Durchmesser von $4,3 \pm 0,5$ mm, der deutlich – jedoch nicht signifikant – niedriger ist als von den Tieren mit Zuchterfahrung. Bei 16 Messvorgängen wurden, mittels Knopfkanüle lokal $0,4 \mu\text{g}$ rhRLX appliziert und nach 30-minütiger Einwirkzeit der Zervix-Innendurchmesser erneut bestimmt. Die ermittelten Ergebnisse wurden in Tabelle 4.1 den jeweiligen Ausgangswerten gegenübergestellt und in Tabelle 4.2 statistisch ausgewertet. Dabei ergaben die Werte vor Relaxinapplikation bei den entsprechenden Tieren ($n=16$) einen durchschnittlichen Innendurchmesser von $5,0 \pm 1,2$ mm. Der durchschnittliche Wert nach 30-minütiger lokaler Einwirkung von Relaxin ergab $5,8 \pm 1,0$ mm. Dieser Wert ist wiederum deutlich, aber nicht signifikant erhöht im Vergleich mit dem Messwert vor der Relaxin-Applikation. Die durchschnittliche Differenz zwischen der 1. und 2. Messung und somit die durchschnittliche Erweiterung beträgt $0,84 \pm 0,4$ mm. Auch hier wurde die Unterteilung in Gruppen von Tieren mit und ohne Zuchterfahrung berücksichtigt (Tab. 4.2). Die durchschnittliche Erweiterung nach Relaxin-Applikation lag bei den Tieren mit Zuchterfahrung bei $0,8 \pm 0,3$ mm. Bei den Tieren ohne Zuchterfahrung betrug sie $1,0 \pm 0,5$ mm. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Werten.

Aus diesen Werten ist ersichtlich, dass einerseits die lokale Applikation von rekombinantem humanen Relaxin an die Zervixportio bei den entsprechenden Tieren zu einem durchschnittlich um $0,84$ mm erweiterten Durchmesser führte, auch wenn der Unterschied zwischen Ausgangswert und 2. Messwert jeweils nicht signifikant ist. Weiterhin ist zu sehen, dass der Ausgangsdurchmesser bei den Tieren mit bereits erfolgten Geburten mit $5,2 \pm 1,3$ mm deutlich, aber nicht signifikant über dem Wert der Tiere ohne Zuchterfahrung mit $4,3 \pm 0,6$ mm liegt. Auch der Zervix-Durchmesser nach der Relaxinapplikation war bei den Tieren mit Zuchterfahrung höher als bei denen ohne ($5,9 \pm 1,1$ mm versus $5,3 \pm 0,3$ mm). Interessant ist hier v.a. die Betrachtung der Differenz zwischen den Werten der 1. und 2. Messung. Hier beträgt die durchschnittliche Erweiterung bei den Tieren mit Zuchterfahrung ca. $0,81 \pm 0,3$ mm. Bei den Tieren ohne Zuchterfahrung beträgt die durchschnittliche Erweiterung $1,0 \pm 0,5$ mm und ist somit nicht signifikant, aber dennoch deutlich höher als bei den Tieren ohne Zuchterfahrung.

Tabelle 4.1: Messung des Zervix-Innendurchmessers *in vivo*; Einteilung der Tiere in Gruppen mit (+) und ohne (-) Zuchterfahrung; Anzahl der Versuche pro Tier

Tier-Nr.:	Zucht- erfahrung +/-	Anzahl der Versuche	1. Messung (Ausgangswert) Durchmesser in mm	2. Messung nach RLX Durchmesser in mm	Differenz 1./2. Messung in mm
W301	+	1.	3	4	1
		2.	6	6	0
		3.	7	7,5	0,5
W321	+	1.	3	-	-
		2.	5,5	-	-
		3.	7	-	-
		4.	7	7,5	0,5
W329	+	1.	4,5	-	-
		2.	5	-	-
		3.	4	5	1
W357	+	1.	5	-	-
		2.	4	5	1
		3.	4	5	1
W358	+	1.	5	6	1
		2.	5,5	6	0,5
		3.	5	6	1
W368	+	1.	5	-	-
		2.	5	-	-
		3.	6	7	1
		4.	6	7	1
W371	+	1.	3,5	-	-
		2.	5	-	-
		3.	4	5	1
W415	-	1.	4	5	1
W427	-	1.	4	-	-
		2.	3,5	-	-
		3.	5	5,5	0,5
W492	-	1.	3,5	-	-
		2.	4	-	-
		3.	4	5,5	1,5
MW			4,75		
SD			1,14		

1. Messung: Ausgangswerte ohne Relaxinapplikation; 2. Messung: 30 min nach lokaler Applikation von 0.4 µg rhRLX mittels Knopfkanüle; Differenz zwischen 1. und 2. Messung entspricht Erweiterung des Durchmessers nach rhRLX-Applikation

Tabelle 4.2: Einfluss der Relaxinapplikation auf den Zervix-Innendurchmesser (Angaben in mm) unter Beachtung der Zuchterfahrung (mit Zuchterfahrung: +; ohne Zuchterfahrung: -)

Tier-Nr./ Versuchs- Nr.	Vor RLX		Nach RLX		Differenz	
	+ Zucht- erfahrung	- Zucht- erfahrung	+ Zucht- erfahrung	- Zucht- erfahrung	+ Zucht- erfahrung	- Zucht- erfahrung
W301/1	3		4		1	
W301/2	6		6		0	
W301/3	7		7,5		0,5	
W321/4	7		7,5		0,5	
W329/3	4		5		1	
W357/2	4		5		1	
W357/3	4		5		1	
W358/1	5		6		1	
W358/2	5,5		6		0,5	
W358/3	5		6		1	
W368/3	6		7		1	
W368/4	6		7		1	
W371/3	4		5		1	
W415/1		4		5		1
W427/3		5		5,5		0,5
W492/3		4		5,5		1,5
MW	5,2	4,3	5,9	5,3	0,81	1,0
SD	1,3	0,6	1,1	0,3	0,3	0,5
NV	0,131	0,089	0,253	0,089	<0,01	0,654
MW mit+ohne Zucht	5,0		5,8		0,84	
SD	1,2		1,0		0,4	
NV	0,02		0,197		<0,001	
t-test bzw. MWRS-Test mit/ohne Zucht	0,306 n.s.		0,382 n.s.		0,588 n.s.	
MWRS-Test vor/nach RLXgesamt	0,07 n.s.					
t-test vor/nach RLX mit Zucht	0,113 n.s.					
t-test vor/nach RLX ohne Zucht		0,055 n.s.				

statistische Auswertung: MW=Mittelwert; SD=Standartabweichung; NV=Normalverteilung ($p>0,05$), *kursiv*: nicht normalverteilt; t-test bzw. Mann-Whitney Rank-Sum (MWRS-) Test ($p<0,05$), n.s.= nicht signifikant

4.2 Untersuchung der Organe

Für die folgenden Versuche stand Organmaterial der unter Punkt 3.1.1.2 im Abschnitt „Material und Methoden“ aufgeführten Tiere zur Verfügung. Es wurden Zervices von Tieren aus den unter Punkt 3.1.1.2 genannten Versuchsgruppen untersucht: 1) von intakten, zyklischen Tieren, 2) von intakten, lokal mit 0,4 µg rhRelaxin behandelten Tieren sowie 3) von Tieren, die zur weitgehenden Ausschaltung endogener Hormonquellen ovariectomiert und anschließend systemisch mit Östradiol und Relaxin bzw. einer Kombination aus beiden Hormonen behandelt wurden. Von der Versuchsgruppe 3 (ovariectomierte und systemisch hormonbehandelte Tiere) wurden die Zervix-Nassgewichte bestimmt. Weiterhin wurden Organe aller Versuchsgruppen wie im Abschnitt „Material und Methoden“ (Abschnitt 3.2.3) beschrieben, histologisch, immunhistochemisch sowie molekularbiologisch untersucht. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sind im Folgenden aufgeführt.

4.2.1 Bestimmung der Zervix-Nassgewichte

Die Zervix-Nassgewichte wurden von den Organen der ovariectomierten und systemisch hormonbehandelten Tiere bestimmt. In der Kontrollgruppe (K) wurde ein durchschnittliches Gewicht von $0,1 \pm 0,04$ g ermittelt. Die Bestimmung der Nassgewichte der Zervices der hormonbehandelten Tiere ergab folgende durchschnittliche Werte: in der Gruppe der mit Östradiol behandelten Tiere (E2) $0,27 \pm 0,07$ g, für die mit Relaxin behandelten Tiere (RLX) $0,25 \pm 0,04$ g und in der Gruppe der mit einer Kombination aus E2 und RLX behandelten Tiere (E2+RLX) $0,30 \pm 0,11$ g. Die ermittelten Werte sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

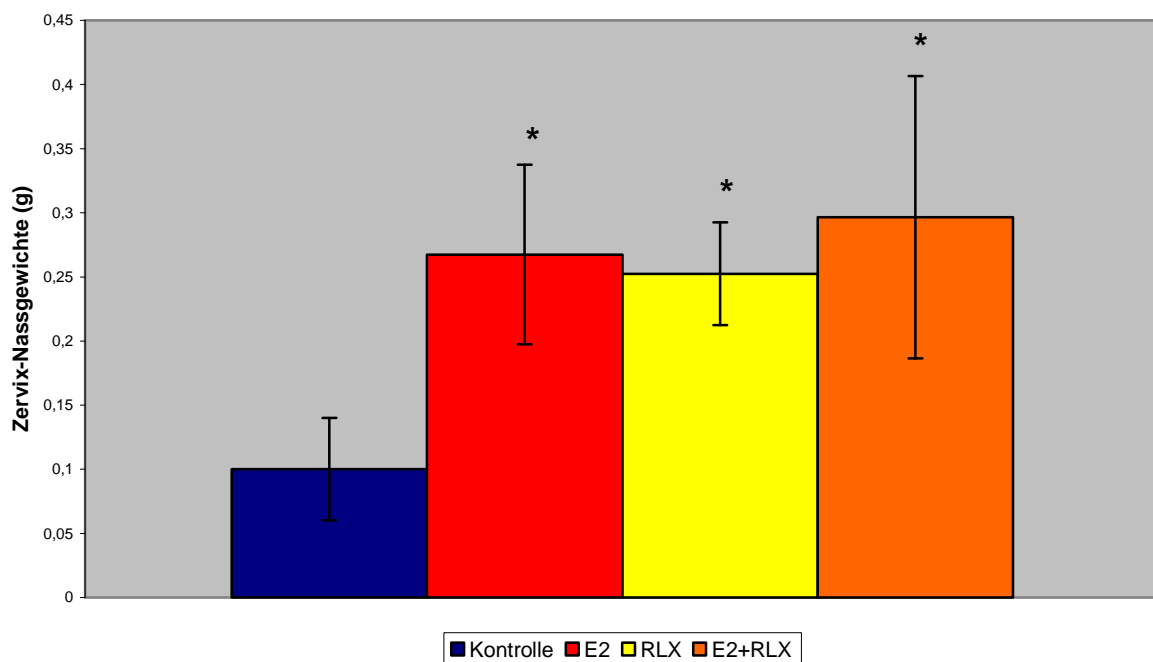


Abb. 4.1

Zervix-Nassgewichte in Gramm ovariectomierter, systemisch hormonbehandelter Tiere; MW±SD;

* signifikanter Unterschied zur Kontrolle; Tierzahl pro Gruppe: K, E2, RLX: n=4; E2+RLX: n=6

Alle für die jeweilige Gruppe bestimmten Werte sind normalverteilt ($p > 0,05$; K: $p = 0,710$; E2: $p = 0,256$; RLX: $p = 0,544$; E2+RLX: $p = 0,216$). Der t-test ergab einen jeweils signifikanten Unterschied der Gewichte in allen hormonbehandelten Gruppen im Vergleich mit der Kontrollgruppe ($p < 0,05$; E2: $p = 0,007$; RLX: $p = 0,002$; E2+RLX: $0,01$). Die Werte der hormonbehandelten Gruppen ergaben untereinander keine statistisch signifikanten Unterschiede.

4.2.2 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

Die histologischen Methoden wurden zur Darstellung der Morphologie der Zervix, insbesondere der Struktur der Extrazellulären Matrix sowie des Auftretens besonderer Zellen wie eosinophile Granulozyten genutzt. Immunhistochemische Techniken wurden zum Nachweis der Steroidrezeptoren, des Relaxinrezeptors, des Relaxins selbst sowie von Enzymen wie der 17 β HSD7 (Steroidhormonsynthese) bzw. kollagenolytischen Enzymen (MMP-1, -2, -9) durchgeführt. Zur Untersuchung der Gefäßversorgung im zervikalen Gewebe wurde weiterhin das Aktin in den Blutgefäßwänden dargestellt. Die Beschreibung der Blutgefäße in der folgenden Zusammenstellung der histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse unterscheidet nicht zwischen arteriellen, venösen und kapillären Gefäßen. Aufgrund der Fixierung der Präparate, die keine Organperfusion beinhaltet und der Schneidetechnik, bei der Gefäße auch schräg angeschnitten werden können und damit keine genaue Bestimmung des Gefäßdurchmessers zulassen, war mit den hier angewendeten Methoden eine einheitliche Unterscheidung der einzelnen Blutgefäßtypen nicht immer möglich. Außerdem ist zu beachten, dass neben etablierten Arterien und Venen bei Neubildung von Gefäßen ebenfalls Zwischenstufen auftreten, die eine Zuordnung der Gefäße erschweren. Eine solche Differenzierung der Ergebnisse nach arteriellen und venösen bzw. kapillären Gefäßen war für diese Arbeit nicht notwendig, da es sich nicht um eine rein morphometrische Auswertung handelt.

In den folgenden Abschnitten sind alle Beobachtungen aus der lichtmikroskopischen Betrachtung der Präparate aufgeführt. Zu jeder Färbung wurden für alle Versuchsgruppen Abbildungen zusammengestellt, die zwar typische Merkmale zeigen, jedoch nur einen Ausschnitt aus dem Gesamtbild darstellen.

4.2.2.1 Histologie

Um einen Überblick über den Gewebeaufbau der Organe zu erhalten, wurde die H&E-Färbung durchgeführt. Bei dieser histologischen Färbemethode werden Zellkerne und Zytoplasma unterschiedlich dargestellt: das verwendete Hämalun führt zu einer violetten bis blavioletten Färbung der Zellkerne, durch das Eosin wird das Zytoplasma rosa bis pinkfarben angefärbt.

Um besondere Ergebnisse aus dieser Färbung in bezug auf Unterschiede in der Struktur des Bindegewebes sowie häufig auftretende Zellen wie Granulozyten näher zu untersuchen, wurden weitere, spezielle histologische Färbungen durchgeführt. Dies waren zum einen die Masson-Trichrom- sowie die Pikrosiriusrot-Färbung zur Darstellung der kollagenen Fasern der Extrazellulären Matrix (ROMEIS 1989). Bei der Trichrom-Färbung nach Masson führt die Verwendung des Eisenhämatoxylins zu einer Dunkelviolett- bis Schwarzfärbung der Zellkerne. Durch Scarlet-Acid-Fuchsin werden Zytoplasma und Muskelfasern rot angefärbt.

Die kollagenen Fasern werden durch die Anfärbung mit Anilinblau leuchtend blau dargestellt (Färbearbeitung des Herstellers Sigma-Aldrich). Bei Anwendung der Pikrosiriusrot-Methode ist das Zytoplasma der Epithelzellen leicht rosa bis gelblich gefärbt. Die Kerne zeigen eine hellviolette bis violette Farbe. Die Kollagenfasern der Extrazellulären Matrix werden rosa bis rosarot dargestellt. Die Muskelfasern erscheinen ähnlich dem Zytoplasma der Epithelzellen leicht rosa bis gelblich gefärbt.

Zum anderen wurde die Siriusrot-Färbung zum Nachweis von eosinophilen Granulozyten durchgeführt, bei der die Kerne aller Zellen im Gewebe durch Anfärbung mit Hämalaun dunkelviolettschwarz und die Granula der Eosinophilen durch den Siriusrot-Farbstoff leuchtend rot angefärbt werden (REIBIGER und SPANEL-BOROWSKI 2000).

4.2.2.1.1 Intakte, zyklische Tiere

In der H&E-Färbung dieser Tiere (Abb. 4.2 A-C) ist der typische Aufbau einer Schleimhaut (Mucosa) zu erkennen. Das in den Präparaten sichtbare Epithel der Zervix ist einschichtig hochprismatisch. Teilweise ist ebenfalls mehrschichtiges, nicht verhornendes Plattenepithel vorhanden. Die Zellkerne sind oval bis länglich und violett gefärbt. Bei stärkerer Vergrößerung ist ein deutlicher Nukleolus zu sehen. Im einschichtigen Epithel kommen zusätzlich langgezogene, schmale, spindelförmige und dunkelviolettschwarze Kerne vor. Das Zytoplasma färbt sich typisch rosa an und weist im hochprismatischen Epithel z.T. Granula oder Vakuolen auf. An der luminalen Seite der Epithelzellen ist teilweise deutlich sichtbares Sekret vorhanden, v.a. in der späten Follikelphase (Abb. 4.2 A).

Die Lamina propria der Tunica mucosa besteht aus vornehmlich rosa angefärbtem faser- und zellhaltigen Material, dem Bindegewebe. Neben rosafarbenen Fasern sind zwei Typen von Zellen erkennbar: größere, spindelförmige Zellen mit rosafarbenem Zytoplasma und längsovalen, hellvioletten Kernen sowie kleinere Zellen mit runden oder segmentierten, dunkelvioletten bis schwarzen Zellkernen und einem dünnen Zytoplasmasaum bzw. leuchtend rosa granuliertem Zytoplasma. Erstere entsprechen in ihrer Erscheinung den Fibrozyten oder Fibroblasten, letztere stellen eingewanderte Zellen wie z.B. Lymphozyten oder eosinophile Granulozyten dar. Eosinophile sind v.a. in der späten Follikelphase (sFP, 7.Tag FP) zu sehen. Zwischen den Fasern und Zellen befinden sich weiterhin Blutgefäße. Die Dichte des Gewebes der Lamina propria ist je nach Zyklusphase unterschiedlich: in den Präparaten der späten Follikelphase (Abb. 4.2 A) bzw. späten Lutealphase (sLP, 13./14. Tag LP; Abb. 4.2 C) erscheint das Gewebe lockerer als in der frühen Lutealphase (fLP, 7./8. Tag LP; Abb. 4.2 B). Dieser Eindruck konnte sowohl durch die Masson-Trichrom- als auch die Pikrosiriusrot-Färbung bestätigt werden. In der Masson-Trichrom-Färbung (Abb. 4.4 A-C) sind leuchtend blaue und in der Pikrosiriusrot-Färbung (Abb. 4.6 A+B) rosafarbene, z.T. wellenartige, in der frühen Lutealphase eher dicht gepackte und geordnete und in später Follikel- und später Lutealphase aufgelockerte und bei stärkerer Vergrößerung deutlich netzförmig angeordnete Fasern zu sehen.

Eine Lamina muscularis mucosae ist nicht zu erkennen, so dass die Lamina propria erwartungsgemäß optisch nicht von der Tunica submucosa trennbar ist. Die Bezeichnung „Lamina propria“ soll in allen folgenden Beschreibungen für beide Bindegewebeanteile stehen.

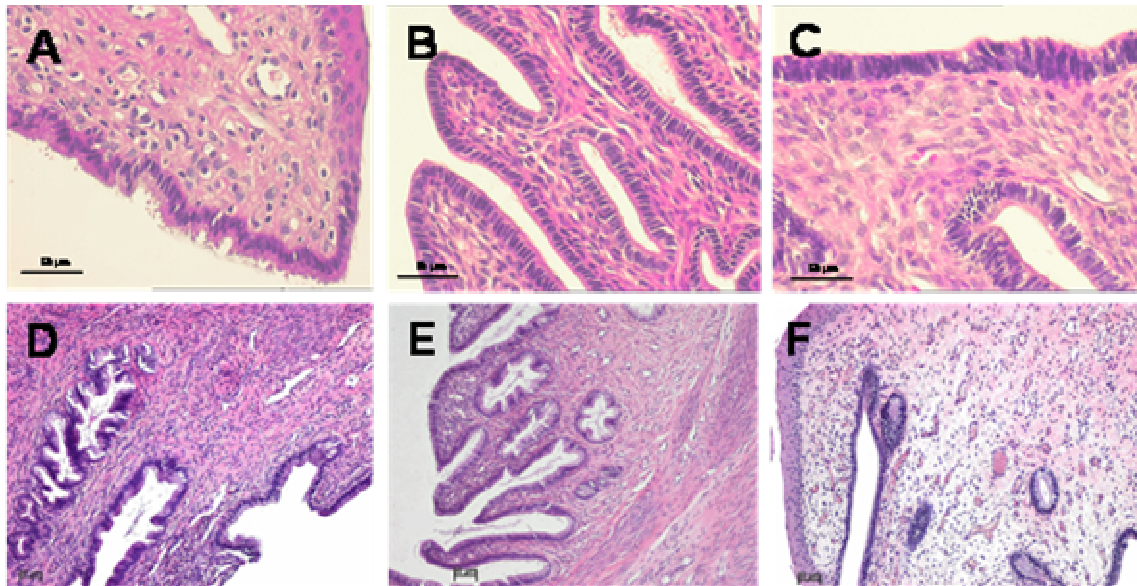


Abb. 4.2:
Histologische Färbung mit Hämalaun und Eosin von Zervix-Gewebe intakter, zyklischer Tiere (A: späte Follikelphase, B: frühe Lutealphase, C: späte Lutealphase) sowie intakter, lokal mit Relaxin behandelter Tiere (Einwirkzeit des Relaxins: D: ½ h; E: 1 h, F: 2 h). Färbung der Zellkerne blau-violett, Darstellung des Zytoplasmas rosafarben. Balken = 50 µm.

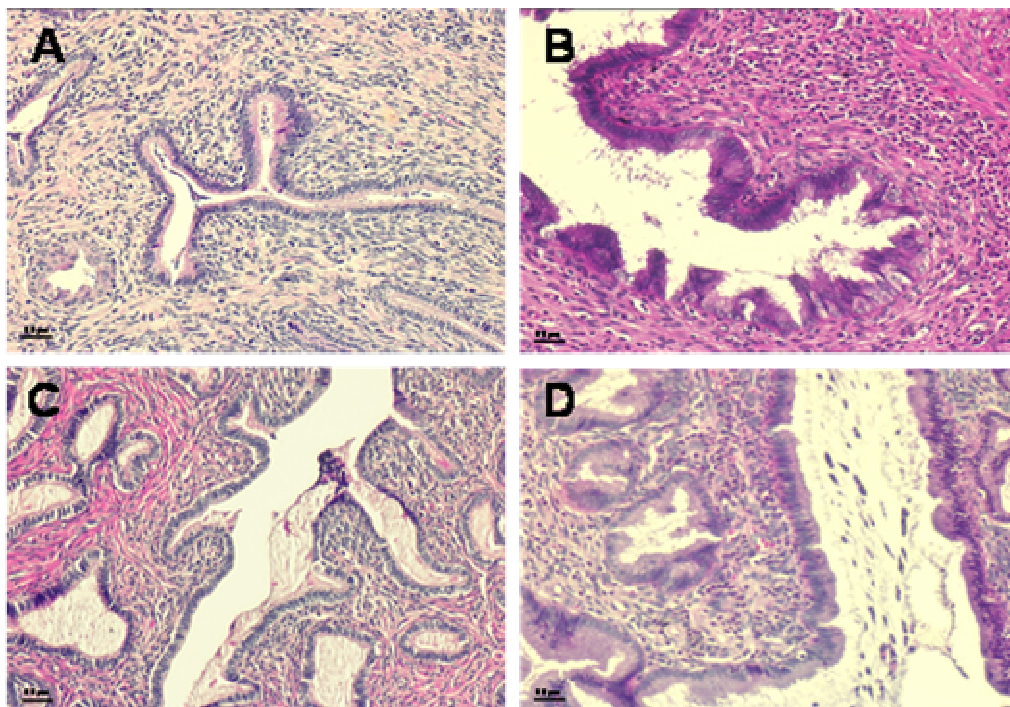


Abb. 4.3:
Histologische Färbung mit Hämalaun und Eosin von Zervix-Gewebe ovariectomierter, systemisch hormonbehandelter Tiere. A: Kontrollgruppe ohne Hormonbehandlung, B: Behandlung mit E2, C: Behandlung mit RLX, D: Behandlung mit E2 und RLX in Kombination. Färbung der Zellkerne blau-violett, Darstellung des Zytoplasmas rosafarben. Balken = 50 µm.

Als nächste Schicht schließt sich die Tunica muscularis an, bei der z.T. deutlich zwischen der inneren Ring- und der äußeren Längsmuskelschicht unterschieden werden kann. Zwischen den Muskelzellen befindet sich wiederum faser- und zellhaltiges Bindegewebe mit Blutgefäßen. In der Masson-Trichrom- sowie Pikrosiriusrot-Färbung ist zu erkennen, dass die Kollagenfasern einerseits perivaskulär meist dichter, andererseits insgesamt v.a. in der späten Follikel- und späten Lutealphase relativ locker angeordnet sind (Abb. 4.4 und 4.6 A+B).

Den äußeren Abschluss des Zervixgewebes bildet eine nur z.T. sichtbare einschichtige Serosa. In vielen Schnitten ist gefäßführendes Fettgewebe als abschließende Schicht vorhanden.

4.2.2.1.2 Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere

Die Präparate der lokal mit Relaxin behandelten Tiere (Abb. 4.2 C-F) zeigen in der H&E-Färbung hochprismatisches und stellenweise mehrschichtiges Epithel. Im hochprismatischen Epithel ist bei allen Tieren eine deutliche Sekretion erkennbar. In der Lamina propria befinden sich Anhäufungen von Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten, v.a. in den Präparaten mit ½ h, aber auch nach 1 und 2 h Einwirkzeit von Relaxin.

Es kommen im Bindegewebe der Lamina propria und der Muskelschicht deutlich sichtbare Blutgefäße vor, deren gehäuftes Auftreten besonders nach 2-stündiger Relaxinwirkung auffällt.

Die Dichte der Bindegewebeschicht ist in den einzelnen Gruppen wiederum unterschiedlich, was in der Masson-Trichrom- bzw. Pikrosiriusrot-Färbung (Abb. 4.4 bzw. 4.6 C-F) bestätigt werden konnte: Nach ½ h sind die Kollagenfasern der Lamina propria relativ dicht und geordnet. Nach 1 h Einwirkzeit erscheint die Lamina propria breiter mit stellenweise relativ lockeren Fasern.

Nach 2 h Einwirkzeit ist die Lamina propria ebenfalls verbreitert und die Fasern sind hauptsächlich locker und nur stellenweise dichter gelagert. Eine Auflockerung der Fasern ist v.a. perivaskulär zu sehen.

In den Präparaten der lokal mit Relaxin behandelten Tiere sind somit v.a. Unterschiede in der Struktur des Bindegewebes zu erkennen. Eine steigende Relaxin-Einwirkzeit scheint tendenziell zu einer erhöhten Auflockerung des Gewebes führen zu können.

4.2.2.1.3 Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere

In den Präparaten der Kontrollgruppe (K) (Abb. 4.3 A) ist iso- bis hochprismatisches sowie mehrschichtiges Epithel vorhanden. In der Lamina propria, die bei allen Präparaten relativ schmal und kompakt ausgeprägt ist, sind z.T. Drüsen sowie vereinzelt eosinophile Granulozyten zu finden. Die Zellen der Muskelschicht sind in der Regel dicht gepackt mit fokalen Auflockerungen.

In der Gruppe „E2“ (Abb. 4.3 B) ist typischerweise hochprismatisches Epithel mit Arealen mehrschichtigen Epithels vorhanden. Es sind bei stärkerer Vergrößerung Vakuolen im Zytoplasma sowie eine Sekretion der Epithelzellen erkennbar. Die Lamina propria ist breit und locker. Sie beinhaltet z.T. Drüsen und einige kleine Blutgefäße. In jedem der Präparate sind Ansammlungen eosinophiler Granulozyten in dieser Gewebeschicht auffällig.

Auch in der Muskelschicht sind die Fasern optisch lockerer angeordnet und zwischen ihnen sind v.a. in der Umgebung der Blutgefäße ebenfalls Eosinophile zu finden.

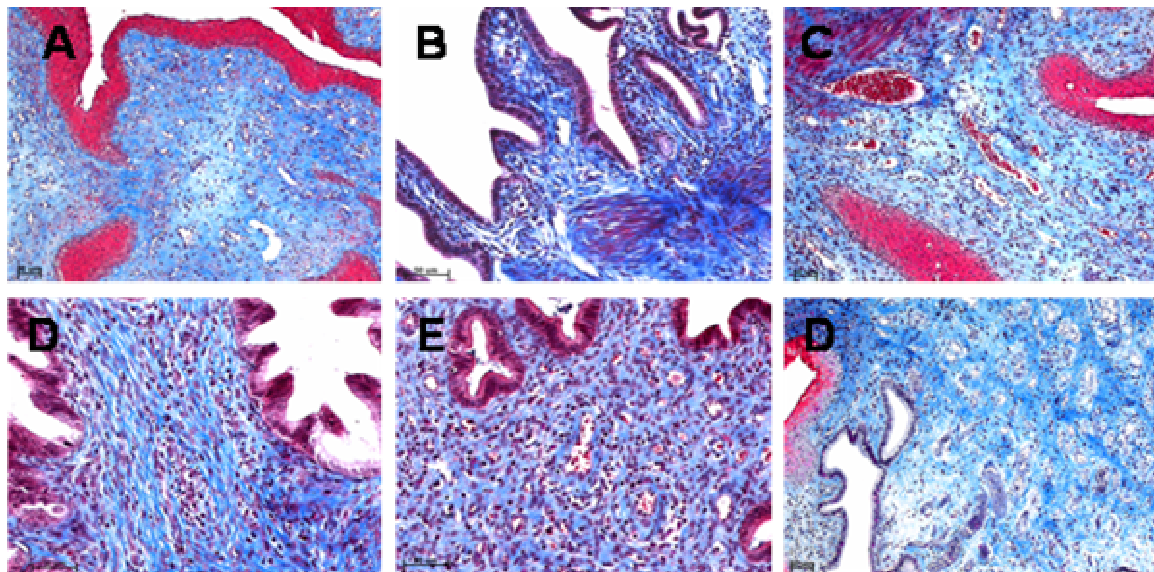


Abb. 4.4:
Masson-Trichrom-Färbung zur Darstellung der Kollagenfasern in der Extrazellulären Matrix der Zervix intakter, zyklischer Tiere (A: späte Follikelphase, B: frühe Lutealphase, C: späte Lutealphase) sowie intakter, lokal mit Relaxin behandelter Tiere (Einwirkzeit des Relaxins: D: ½ h; E: 1 h, F: 2 h). Färbung der Zellkerne schwarz und des Zytoplasmas rosarot, Darstellung der kollagenen Fasern blau. Balken = 50 µm.

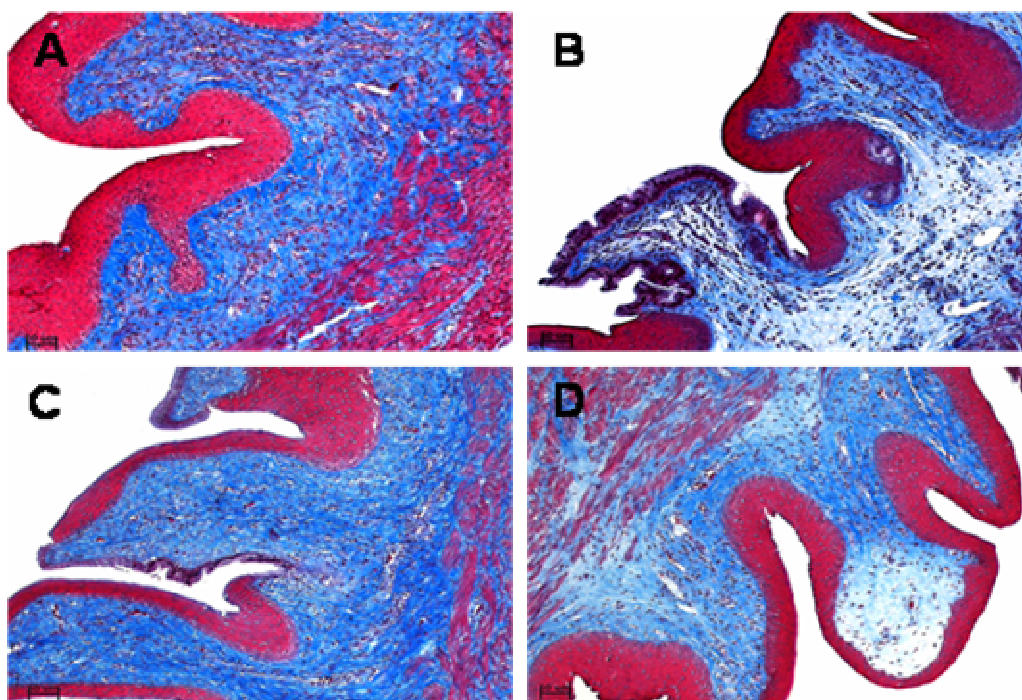


Abb. 4.5:
Masson-Trichrom-Färbung zur Darstellung der kollagenen Fasern der Extrazellulären Matrix in der Zervix ovariectomierter, systemisch hormonbehandelter Tiere. A: Kontrollgruppe ohne Hormonbehandlung, B: Behandlung mit E2, C: Behandlung mit RLX, D: Behandlung mit E2 und RLX in Kombination. Färbung der Zellkerne schwarz und des Zytoplasmas rosa bis rot, Darstellung der Kollagenfasern blau. Balken = 50 µm.

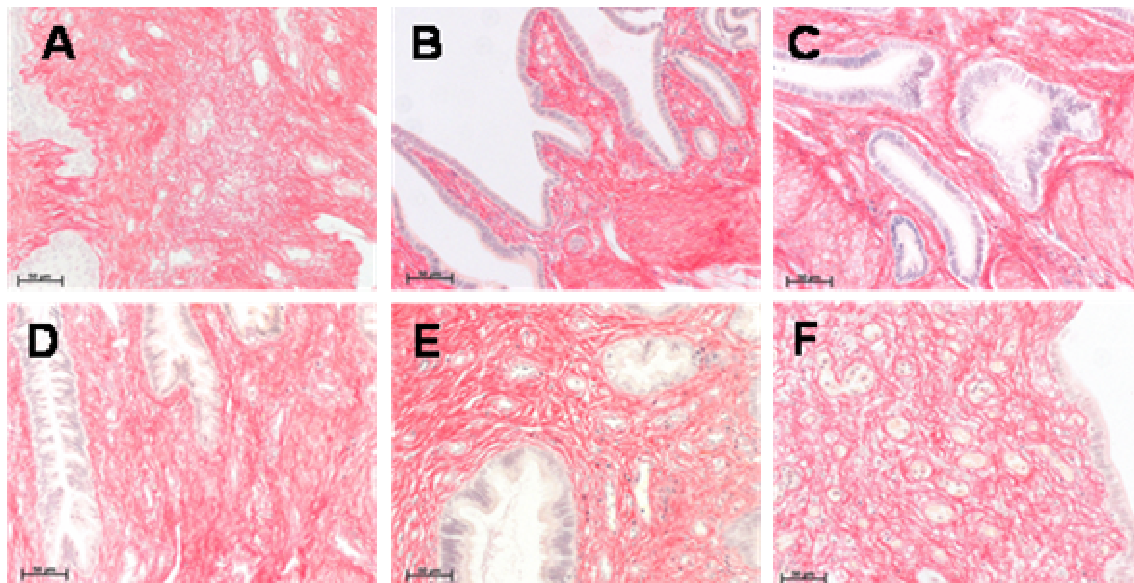


Abb. 4.6:
Pikrosiriusrot-Färbung zur Darstellung der Kollagenfasern in der Extrazellulären Matrix der Zervix intakter, zyklischer Tiere (A: späte Follikelphase, B: frühe Lutealphase, C: späte Lutealphase) sowie intakter, lokal mit Relaxin behandelter Tiere (Einwirkzeit des Relaxins: D: ½ h; E: 1 h, F: 2 h). Färbung der Zellkerne hellviolett und des Zytoplasmas rosa bis gelblich, Darstellung der kollagenen Fasern rosarot. Balken = 50 µm.

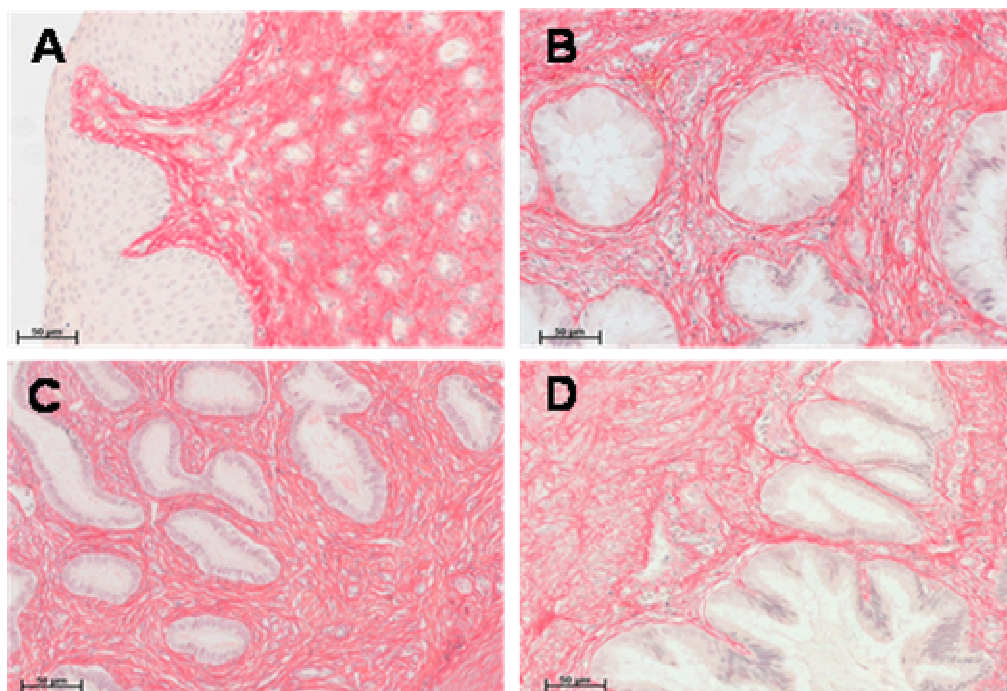


Abb. 4.7:
Pikrosiriusrot-Färbung zur Darstellung der kollagenen Fasern der Extrazellulären Matrix in der Zervix ovariectomierter, systemisch hormonbehandelter Tiere. A: Kontrollgruppe ohne Hormonbehandlung, B: Behandlung mit E2, C: Behandlung mit RLX, D: Behandlung mit E2 und RLX in Kombination. Färbung der Zellkerne hellviolett und des Zytoplasmas rosa bis gelblich, Kollagenfasern rosarot. Balken = 50 µm.

Das histologische Bild in der Gruppe „RLX“ (Abb. 4.3 C) zeigt v.a. iso-, z.T. hochprismatisches sowie stellenweise mehrschichtiges Epithel. Im hochprismatischen Epithel sind Vakuolen im Zytoplasma sowie eine Sekretion einiger Epithelzellen zu erkennen. Die Lamina propria ist schmaler ausgebildet als in den Präparaten der Gruppe „E2“ jedoch weniger kompakt als in der Kontrollgruppe und weist Drüsen, sowie wenige eosinophile Granulozyten auf. Die Tunica muscularis wiederum erscheint dichter gepackt als in den Präparaten der Gruppe „E2“ und in der Umgebung der Blutgefäße sind wenige Granulozyten zu finden.

In den Präparaten der Gruppe „E2+RLX“ (Abb. 4.3 D) ist neben geringen Anteilen mehrschichtigen Epithels v.a. das typische hochprismatische Zervixepithel vorhanden, welches bei stärkerer Vergrößerung sichtbare Vakuolen und eine deutliche Sekretion aufweist. Die Lamina propria ist breit, i.d.R. locker und mit Drüsen ausgestattet. Es sind auffällige Ansammlungen von sehr vielen Eosinophilen in dieser Gewebeschicht zu sehen. Die Zellen der Muscularis sind ebenfalls locker angeordnet und zwischen ihnen sind v.a. perivaskulär wiederum Nester eosinophiler Granulozyten zu finden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in der H&E-Färbung die auffälligsten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe in den Gruppen „E2“ und „E2+RLX“ zu finden sind. Es sind eine deutliche sekretorische Aktivität des vorherrschenden hochprismatischen Epithels, eine Auflockerung des Stromas sowie eine Einwanderung von Zellen, v.a. von eosinophilen Granulozyten zu sehen. In der Gruppe „RLX“ sind im Vergleich zur Kontrolle nur geringe Veränderungen nachweisbar. Das Epithel ist v.a. iso- und nur stellenweise hochprismatisch und weist eine nicht so starke und nicht so gleichmäßig ausgeprägte Vakuolenbildung bzw. Sekretion auf. Das Stroma insgesamt ist optisch dichter als in den Gruppen „E2“ und „E2+RLX“, aber weniger dicht als in der Kontrollgruppe und es sind nur wenige Granulozyten zu finden.

Die in der H&E-Färbung gemachten Beobachtungen können mit weiteren histologischen Färbungen belegt werden. In der Masson-Trichrom- sowie Pikrosiriusrot-Färbung (Abb. 4.5 bzw. 4.7 A-D) ist zu sehen, dass die Struktur der kollagenen Fasern des Bindegewebes in allen hormonbehandelten Gruppen gegenüber der Kontrolle aufgelockert ist. Besonders in der Gruppe „E2“ sind deutlich aufgelockerte Fasern zu sehen, die bei stärkerer Vergrößerung netzartig angeordnete erscheinen. In der Gruppe E2+RLX sind auch in der Struktur der Kollagenfasern Kombinationseffekte mit Arealen relativ dicht gelagerter „RLX-typischer“ zwischen sonst aufgelockerten, netzartigen, „E2-typischen“ Fasern zu finden.

Zur Bestätigung des in der HE-Färbung erkennbaren, unterschiedlichen Auftretens von eosinophilen Granulozyten in Lamina propria und Tunica muscularis wurden weitere Präparate dieser Gruppen mit Hämalaun und Sirius-Rot gefärbt (Abb. 4.8 und 4.9).

In den Präparaten der Kontrollgruppe (Abb. 4.8 A) konnten nur vereinzelt eosinophile Granulozyten nachgewiesen werden. In der Gruppe „E2“ hingegen (Abb. 4.8 B bzw. 4.9 A) sind deutlich erkennbare Ansammlungen vieler Eosinophiler in der Lamina propria sowie in der Muskelschicht zu finden. In der Gruppe „RLX“ (Abb. 4.8 C) wurden vereinzelte bis wenige eosinophile Granulozyten gefunden. In der Gruppe „E2+RLX“ (Abb. 4.8 D bzw. 4.9 B) bestätigt sich ebenfalls das in der HE-Färbung erzielte Ergebnis: es sind sehr viele Eosinophile in Lamina propria und Muskularis zu finden.

Somit ist durch die mikroskopische Betrachtung eine Tendenz zum vermehrten Vorkommen von Eosinophilen in den Gruppen „E2“ und „E2+RLX“ zu sehen.

Um die erhaltenen, subjektiven Eindrücke mit genaueren quantitativen Angaben zu untermauern, wurden die Zellen in den Präparaten ausgezählt. Die entsprechend erzielten durchschnittlichen Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 und Abbildung 4.7a dargestellt.

Wie aus Tabelle und Diagramm hervorgeht, ist die Anzahl der eosinophilen Granulozyten in den Gruppen „E2“ und „E2+RLX“ mit $27 \pm 6,6$ bzw. $60 \pm 19,4$ Zellen pro Gesichtsfeld tatsächlich deutlich gegenüber der Kontrolle ($7 \pm 5,7$ Zellen pro Gesichtsfeld) erhöht. Allerdings ist nur der für die Gruppe „E2+RLX“ ermittelte Wert signifikant erhöht im Vergleich mit der Kontrolle ($p < 0,05$). Aufgrund einer relativ hohen Variabilität der Zellzahl sowohl innerhalb der einzelnen Präparate (Betrachtung verschiedener Gewebeschichten) als auch zwischen den Präparaten einer Gruppe sind z.T. hohe SEM-Werte vorhanden.

Tabelle 4.3: Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere: Durchschnittliche Anzahl an Eosinophilen pro Sichtfeld (ermittelt bei 400facher Vergrößerung in jeweils 8 Sichtfeldern pro Präparat); $MW \pm SEM$; Tierzahl pro Gruppe: $n=3$

Tiergruppe	Durchschnittliche Anzahl an Eosinophilen pro Sichtfeld
Kontrollgruppe	$7 \pm 5,7$
Gruppe „E2“	$27 \pm 6,6$
Gruppe „RLX“	$10 \pm 7,2$
Gruppe „E2+RLX“	$60 \pm 19,4$

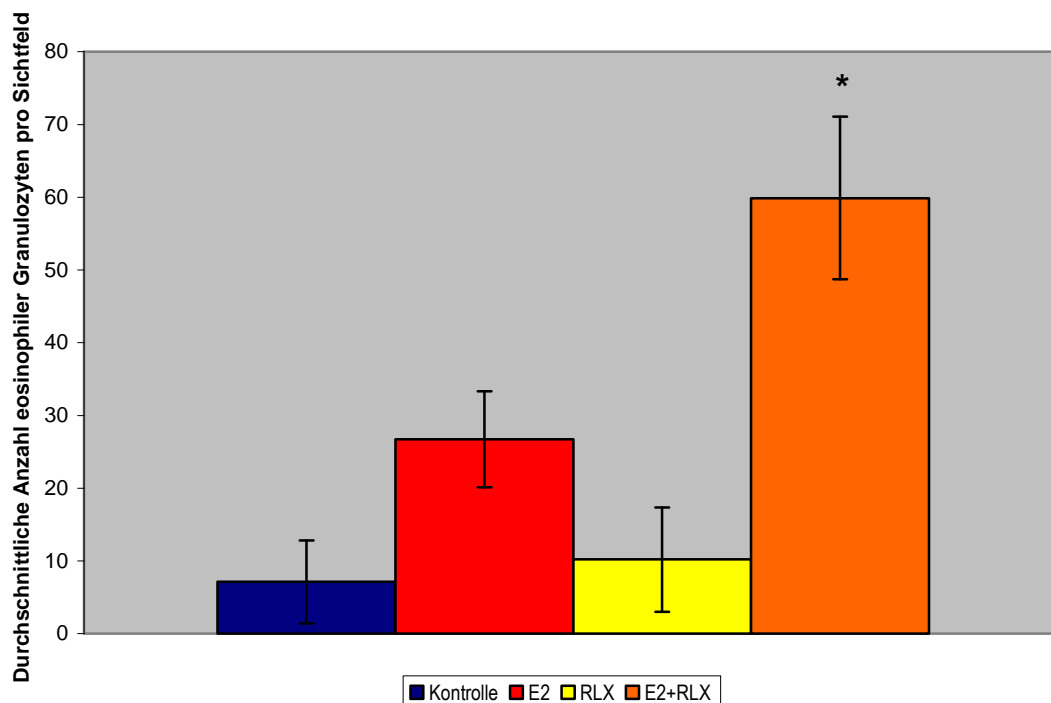


Abb. 4.7a:

Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere: Durchschnittliche Anzahl an Eosinophilen pro Sichtfeld (ermittelt bei 400facher Vergrößerung in jeweils 8 Sichtfeldern pro Präparat); $MW \pm SEM$;

* signifikanter Unterschied zur Kontrolle; Tierzahl pro Gruppe: $n=3$

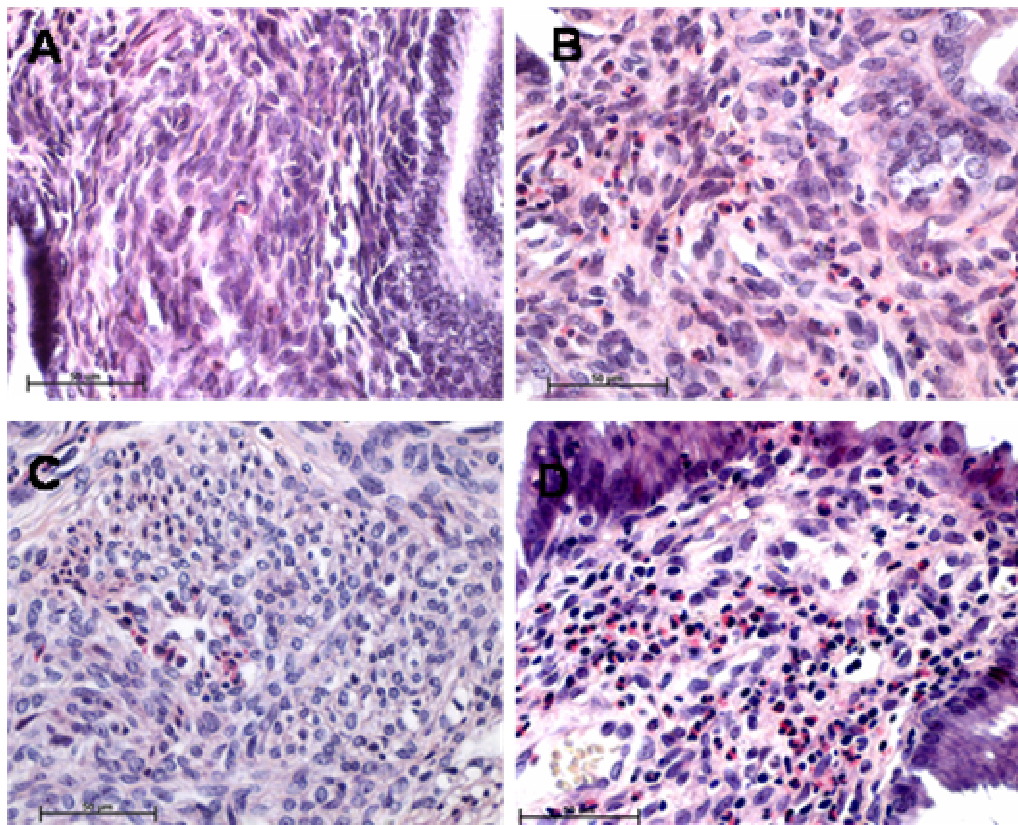


Abb. 4.8:
Histologische Färbung mit Siriusrot und Hämalau zur Darstellung der eosinophilen Granulozyten im Zervix-Gewebe ovariectomierter, systemisch hormonbehandelter Tiere. A: Kontrollgruppe ohne Hormonbehandlung, B: Behandlung mit E2, C: Behandlung mit RLX, D: Behandlung mit E2 und RLX in Kombination. Färbung der Zellkerne blau-violett, Darstellung der eosinophilen Granula leuchtend rot. Balken = 50 µm.

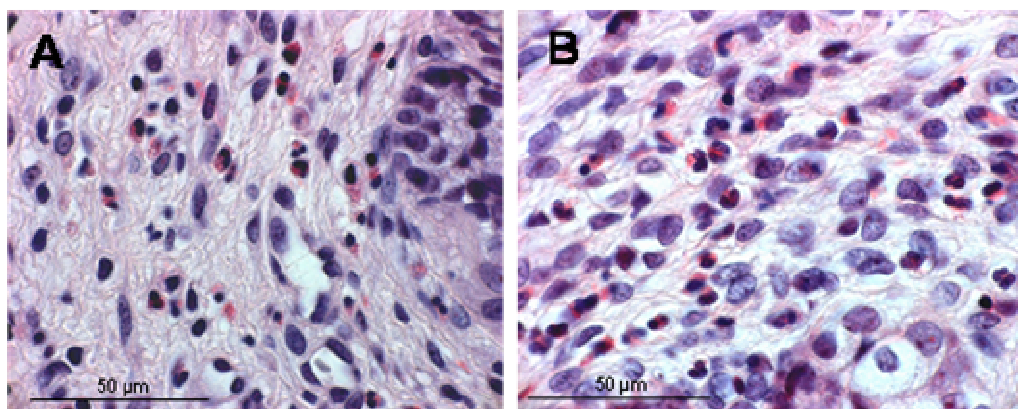


Abb. 4.9:
Histologische Färbung mit Siriusrot und Hämalau zur Darstellung der eosinophilen Granulozyten im Zervix-Gewebe ovariectomierter, systemisch hormonbehandelter Tiere. Vergrößerte Darstellung der Eosinophilen: A: Behandlung mit E2, B: Behandlung mit E2 und RLX in Kombination. Färbung der Zellkerne blau-violett, Darstellung der eosinophilen Granula leuchtend rot. Balken = 50 µm.

4.2.2.2 Immunhistochemie

Die wie in Abschnitt „Material und Methoden“ unter Punkt 3.2.3.2. sowie 3.2.3.3.1 aufgearbeiteten Präparate wurden mit spezifischen Antikörpern auf das Vorhandensein ausgewählter Proteinstrukturen (Antigene) untersucht. Durch den Einsatz des AEC-Peroxidase-Substrat-Kits (Dako) als chromogenes Substrat sind in allen Versuchen rotbraune bis rote Färbungen als positives Ergebnis zu erwarten. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein IgG-Antikörper verwendet, der in der Spezifität und Konzentration jeweils dem spezifischen Antikörper entsprach. Die Negativkontrollen zeigten in allen Versuchen keine spezifische Färbung (Abb. 4.10, 4.12, 4.14, 4.16, 4.18, 4.20, 4.22, 4.24, 4.26 jeweils A).

Die mittels Darstellung des Aktins ermittelte durchschnittliche Gefäßanzahl pro Sichtfeld erfolgte durch Auszählen positiver Gefäße in den immunhistochemischen Präparaten.

Alle weiteren Ergebnisse wurden deskriptiv bzw. semiquantitativ ausgewertet und in Tabelle 4.7 am Ende des Abschnittes „Immunhistochemie“ zusammengefasst. Für ein einheitliches Auswertungsschema wurden folgende Kategorien unterschieden: - = keine positive Reaktion; (+) = nur vereinzelt auftretende positive Zellen, <10%; + = wenig positive Zellen, 10-40%; ++ = einige positiv gefärbte Zellen, 40-70%; +++ = viele Zellen mit positiver Reaktion, >70%.

4.2.2.2.1 Immunhistochemische Darstellung der Steroidrezeptoren

4.2.2.2.1.1 Östradiolrezeptor α

Der Östradiolrezeptor α (ER α) ist ein kernständiger Rezeptor. Somit ist ein positives Signal in den Zellkernen zu erwarten.

4.2.2.2.1.1.1 Intakte, zyklische Tiere

Das mehrschichtige und einschichtige Oberflächenepithel, sowie das Drüsenepithel weisen viele blass bis deutlich rotbraun gefärbte, ER α -positive Kerne auf. Die Form der Kerne ist rund bis oval. In der Lamina propria und der Muskelschicht sind ebenfalls viele (+++) Kerne mit spindelförmiger, ovaler oder runder Form positiv gefärbt.

In den einzelnen Zyklusphasen (Follikel-, Lutealphase) ist kein Unterschied in der ER α -Expression zu verzeichnen (Tab. 4.7 A, Abb. 4.10 B+C).

4.2.2.2.1.1.2 Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere

In den verschiedenen Gruppen der lokal mit Relaxin behandelten Tiere (Abb. 4.10 D-F) sind ebenfalls viele (+++) deutlich positiv gefärbte Kerne in allen Gewebeschichten zu erkennen. Bei W357 (2h) sind positiv gefärbte Gefäßwände zu finden.

Es bestehen ansonsten keine Unterschiede in der Expression des Östradiolrezeptors bei unterschiedlich langer Einwirkzeit des lokal applizierten Relaxins (Tab. 4.7 B).

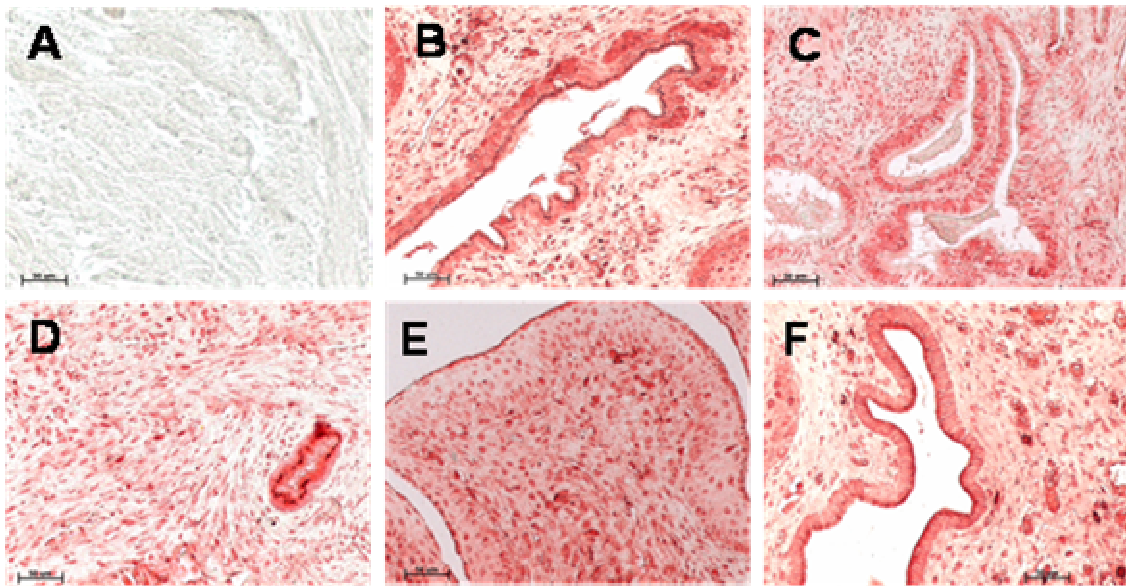


Abb. 4.10:
Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptors α (ER α) in der Zervix intakter, zyklischer Tiere (B: späte Follikelphase, C: späte Lutealphase) sowie intakter, lokal mit Relaxin behandelter Tiere (Einwirkzeit des Relaxins: D: $\frac{1}{2}$ h; E: 1 h, F: 2 h). Färbung positiver Zellkerne rotbraun. A: Negativkontrolle. Balken = 50 μ m.

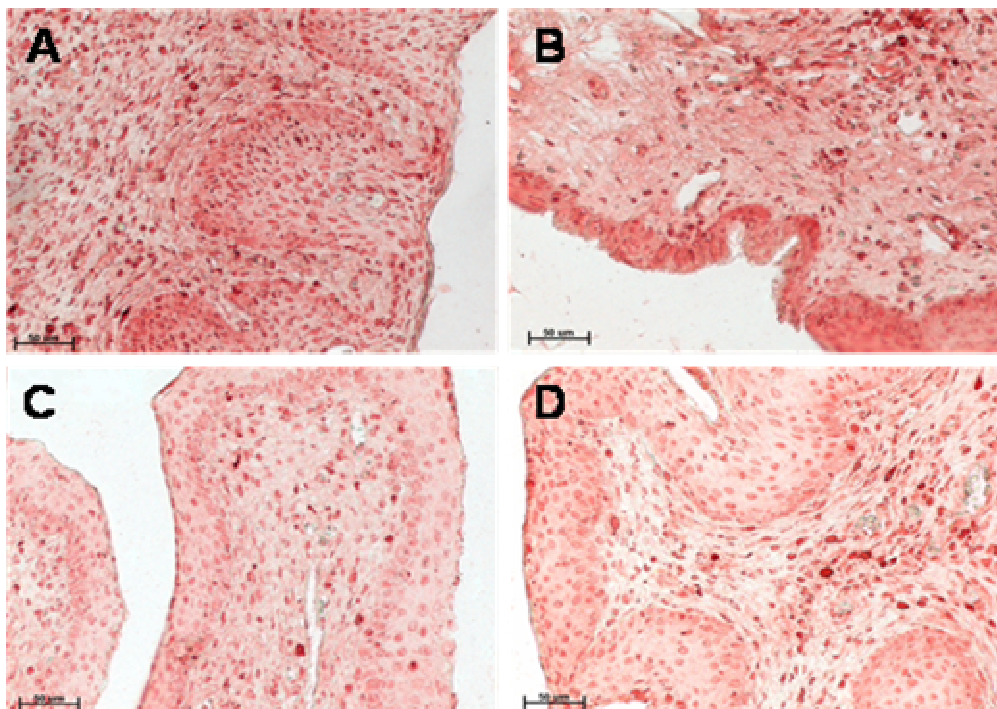


Abb. 4.11:
Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptors α (ER α) in der Zervix ovariectomierter, systemisch hormonbehandelter Tiere A: Kontrollgruppe ohne Hormonbehandlung, B: Behandlung mit E2, C: Behandlung mit RLX, D: Behandlung mit E2 und RLX in Kombination. Färbung positiver Zellkerne rotbraun. Negativkontrolle siehe Abb. 4.10 A. Balken = 50 μ m.

4.2.2.2.1.3 Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere

Auch diese Präparate weisen in Epithel- und Stromazellen viele (+++) gut sichtbar rotbraun gefärbte, ER α -positive Kerne auf (Abb.4.11 A-D). Bei vergleichender Betrachtung der unterschiedlichen Gruppen lässt sich erkennen, dass keine Unterschiede in der Ausprägung der ER α -Expression in den verschiedenen, hormonbehandelten Gruppen zu finden sind (siehe Tab. 4.7 C).

4.2.2.2.1.2 Progesteronrezeptor

Der Progesteronrezeptor (PR) ist wie der ER α ein kernständiger Rezeptor, weshalb auch hier eine Kernfärbung zu finden ist.

4.2.2.2.1.2.1 Intakte, zyklische Tiere

Das mehrschichtige und einschichtige Oberflächen- sowie das Drüsenepithel weisen deutlich rotbraun gefärbte Zellkerne auf. Die Form der Kerne ist rund bis oval. In den meisten Kernen sind bei stärkerer Vergrößerung deutlich sichtbare Aufhellungen bzw. Vakuolen und ungefärbte Nukleoli zu erkennen. In der Lamina propria und der Muskelschicht sind viele (+++) spindelförmige bzw. in der Muskularis eher zigarrenförmige, ovale oder runde Zellkerne PR-positiv gefärbt (Tab. 4.7 A; Abb. 4.12 B+C). Wie beim Nachweis des ER α (siehe 4.2.2.2.1.1.1) ist in den einzelnen Zyklusphasen kein Unterschied in der Expression des PR vorhanden.

4.2.2.2.1.2.2 Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere

In den verschiedenen Gruppen der lokal mit Relaxin behandelten Tiere (Einwirkzeit: ½ h; 1 h; 2 h; Abb. 4.12 D-F) sind einige (++) Zellkerne aller Gewebeschichten PR-positiv gefärbt. Bei W357 (2h) zeigen wiederum Blutgefäßwände eine positive Reaktion. Wie beim Nachweis des ER α (siehe 4.2.2.2.1.1.2) sind ansonsten zwischen den einzelnen Präparaten keine deutlichen Unterschiede in der Expression des PR in Abhängigkeit von der Relaxin-Einwirkdauer zu verzeichnen (siehe Tab. 4.7 B).

4.2.2.2.1.2.3 Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere

Es sind in allen Gruppen (K, E2, RLX, E2+RLX) die Zellkerne vieler (+++) Zellen in Epithel und Stroma PR-positiv gefärbt (Abb. 4.13 A-D). Zudem ist wiederum in allen Präparaten vereinzelt in den Blutgefäßwänden ein positiver Nachweis des PR möglich.

Es besteht insgesamt wie beim Nachweis des ER α (siehe 4.2.2.2.1.1.3) kein deutlicher Unterschied in der Expression des Rezeptors zwischen den einzelnen hormonbehandelten Gruppen einschließlich Kontrollgruppe (Tab. 4.7 C).

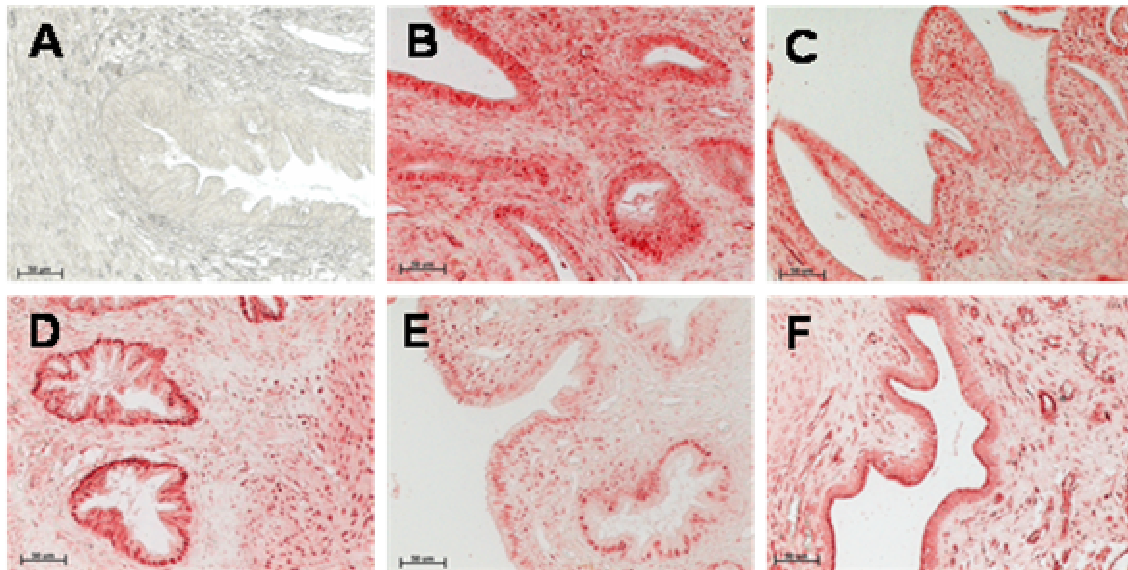


Abb. 4.12:
Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors (PR) in der Zervix intakter, zyklischer Tiere (B: späte Follikelphase, C: späte Lutealphase) sowie intakter, lokal mit Relaxin behandelter Tiere (Einwirkzeit des Relaxins: D: ½ h; E: 1 h, F: 2 h). Färbung positiver Zellkerne rotbraun. A: Negativkontrolle. Balken = 50 µm.

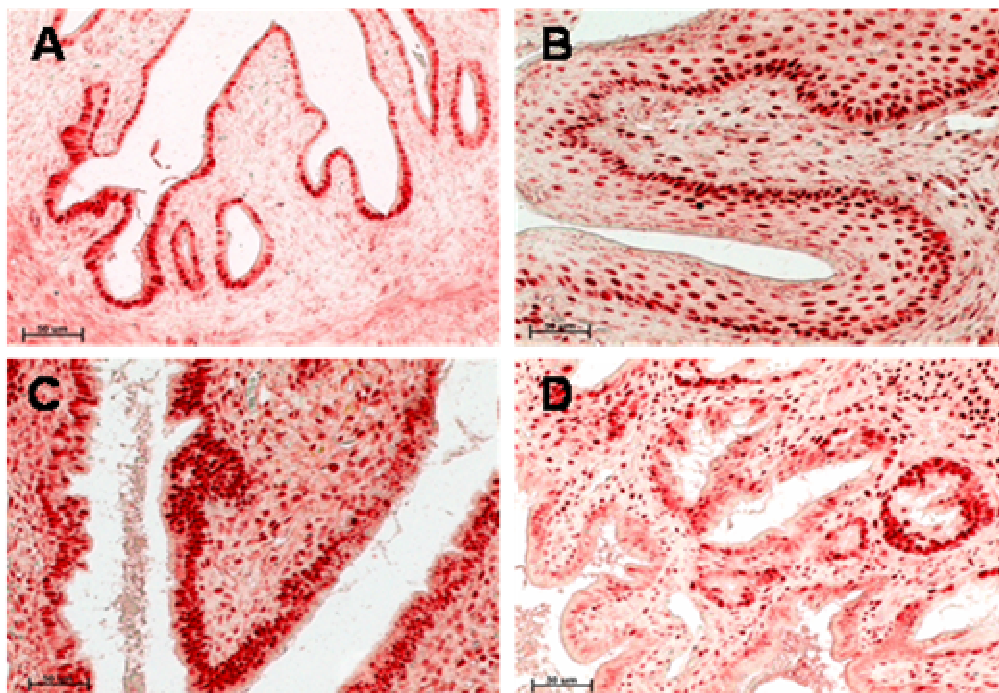


Abb. 4.13:
Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors (PR) in der Zervix ovariectomierter, systemisch hormonbehandelter Tiere. A: Kontrollgruppe ohne Hormonbehandlung, B: Behandlung mit E2, C: Behandlung mit RLX, D: Behandlung mit E2 und RLX in Kombination. Färbung positiver Zellkerne rotbraun. Negativkontrolle siehe Abb. 4.12 A. Balken = 50 µm.

4.2.2.2.2 Nachweis der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-7

Die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 β HSD) ist ein an der Steroidhormonsynthese beteiligtes Enzym. Sie katalysiert die Umwandlung von Androstendion zu Testosteron bzw. von Östron zu Östradiol (PETRIDES 2003; SMITH 1999). Es existieren 11 Untergruppen der 17 β HSD, die in den verschiedenen steroidhormonproduzierenden Organen in unterschiedlicher Ausprägung vorkommen und verschiedene chemische Reaktionen katalysieren. Wichtig in bezug auf die Östradiolsynthese sind die 17 β HSD1 und 17 β HSD7. Die 17 β HSD1 ist in den Granulosazellen des Follikels und in der Plazenta zu finden, wo sie nach dem luteoplazentären Shift der Steroidsynthese Bedeutung hat. Im Corpus luteum und im Uterus zyklischer Weißbüschelaffen herrscht die 17 β HSD7 vor. Sie hat Bedeutung während der Lutealphase und Gravidität. Da die Proteinbiosynthese der Steroidhormone im Zytoplasma abläuft, ist dort ein positiver Nachweis des Enzyms zu erwarten (HUSEN et al. 2003).

4.2.2.2.2.1 Intakte, zyklische Tiere

Bei den zyklischen Tieren ist das Epithel der Präparate jeweils negativ. Auch das Gewebe der Lamina propria und Muskularis ist selbst nicht gefärbt. Eine deutlich positive Reaktion zeigt sich lediglich an wenigen (+) Blutgefäßen, wobei einerseits die Gefäßwände, andererseits perivaskuläre Strukturen als 17 β HSD7-positiv zu erkennen sind, wobei kein Unterschied zwischen den einzelnen Zyklusphasen zu verzeichnen ist (Tab. 4.7 A; Abb. 4.14 B+C).

4.2.2.2.2.2 Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere

In den Präparaten der lokal mit Relaxin behandelten Tiere (Abb. 4.14 D-F) sind im Epithel wenige (+) Zellen schwach positiv gefärbt. In Lamina propria und Muskularis zeigt sich das nun schon bekannte Bild von deutlich 17 β HSD7-positiv gefärbten Gefäßstrukturen, wobei das restliche Gewebe negativ ist.

Ein Unterschied in der Ausprägung der Färbung nach der unterschiedlichen Einwirkzeit des lokal applizierten Relaxins ist nicht zu erkennen (Tab. 4.7 B).

4.2.2.2.2.3 Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere

In den Präparaten aller Gruppen sind im Epithel wenige (+) Zellen 17 β HSD7-positiv gefärbt. Im stromalen Gewebe sind jeweils wenige 17 β HSD7-positive Gefäßstrukturen vorhanden, wohingegen das restliche Gewebe negativ ist (Abb. 4.15 A-D, Tab. 4.7 C).

Es ist demnach auch in dieser Versuchsgruppe kein Unterschied in der Expression dieses Enzyms zwischen den hormonbehandelten Gruppen sowie der Kontrollgruppe verzeichnen.

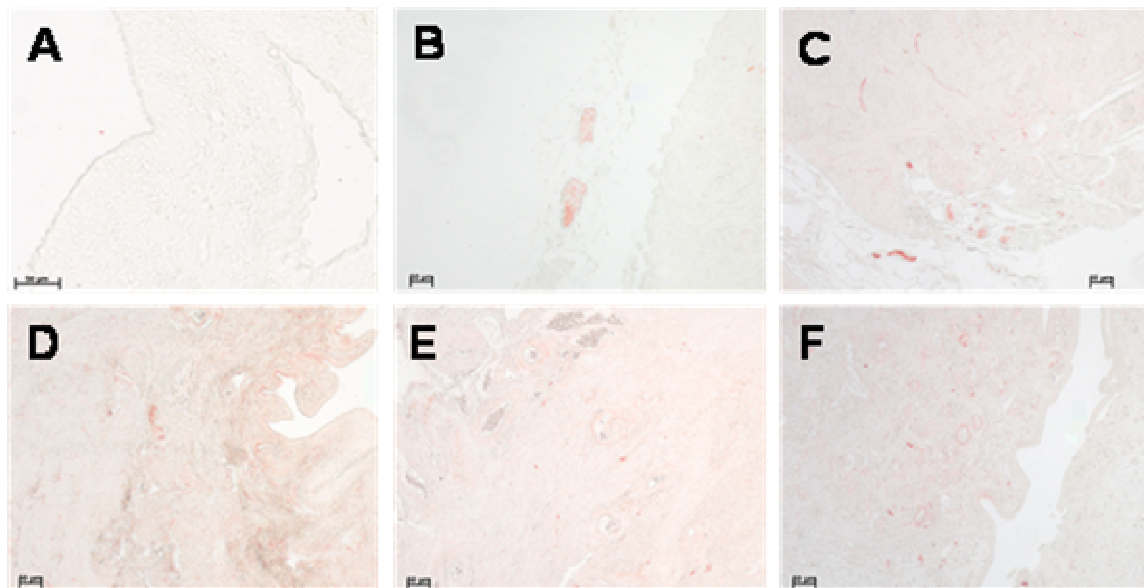


Abb. 4.14:
Immunhistochemischer Nachweis der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-7 (17 β HSD7) in der Zervix intakter, zyklischer Tiere (B: späte Follikelphase, C: späte Lutealphase) sowie intakter, lokal mit Relaxin behandelter Tiere (Einwirkzeit des Relaxins: D: ½ h; E: 1 h, F: 2 h). Färbung positiver Strukturen rotbraun. A: Negativkontrolle. Balken = 50 μ m.

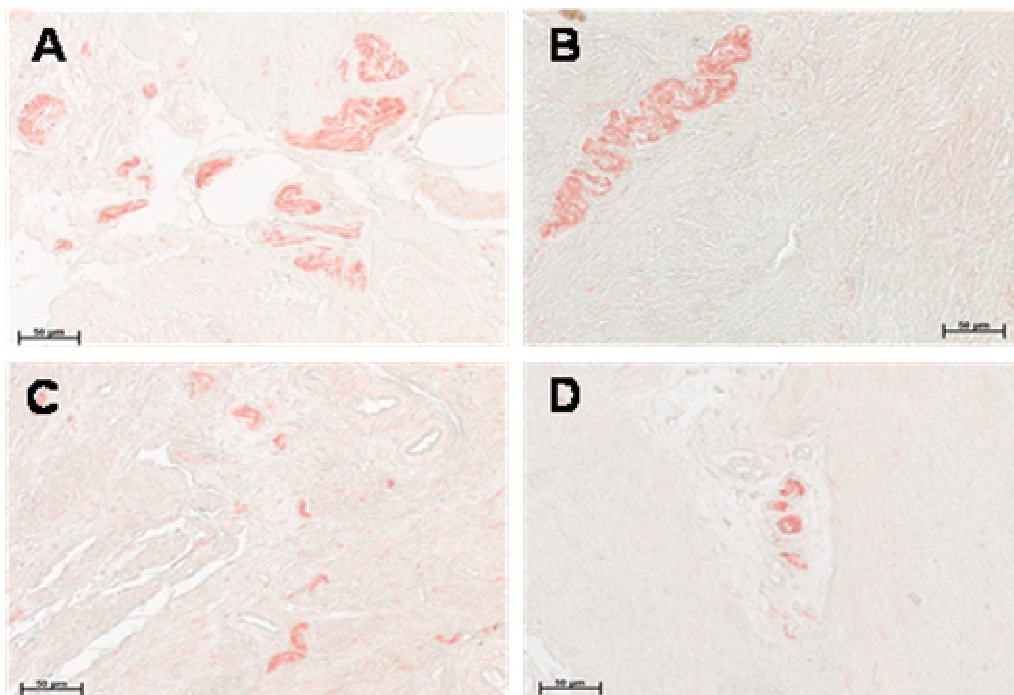


Abb. 4.15:
Immunhistochemischer Nachweis der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-7 (17 β HSD7) in der Zervix ovariektomierter, systemisch hormonbehandelter Tiere. A: Kontrollgruppe ohne Hormonbehandlung, B: Behandlung mit E2, C: Behandlung mit RLX, D: Behandlung mit E2 und RLX in Kombination. Färbung positiver Strukturen rotbraun. Negativkontrolle siehe Abb. 4.14 A. Balken = 50 μ m.

4.2.2.2.3 Immunhistochemische Darstellung des Relaxinrezeptors LGR7

Der Relaxinrezeptor LGR7 gehört zu den membranständigen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (HSU et al. 2002; ANTHONY 1999). Aus diesem Grund ist ein membranassoziierter positiver Nachweis zu erwarten. Es erfolgte keine Kern-Gegenfärbung.

4.2.2.2.3.1 Intakte, zyklische Tiere

In den Präparaten werden in der Regel Zellen im Epithel und in der Lamina propria positiv angefärbt. Dabei ist v.a. im mehrschichtigen Epithel aber auch in stromalen Zellen eine deutlich rotbraune, LGR7-positive Färbung des Zytoplasmas sowie ein im Gegensatz dazu heller und ungefärbter Kern zu erkennen. Aufgrund teilweise vorhandener stark positiver Reaktionen in den Zellen sowie eines unterschiedlichen Anschneidens dieser positiven Zellen, ist zum Teil der negative Kern nicht zu erkennen. Die im Stroma befindlichen LGR7-positiven Zellen zeigen einerseits die Morphologie ortsständiger Bindegewebszellen, andererseits die eingewanderter Zellen wie Granulozyten, die schon in der H&E-Färbung sichtbar waren. Die Expression des LGR7 ist in der späten Follikelphase (++) und v.a. in der späten Lutealphase (+++) besonders stark ausgeprägt (Tab. 4.7 A; Abb. 4.16 B+C).

4.2.2.2.3.2 Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere

Bei diesen Präparaten sind die Zellen des Epithels meist ungefärbt. In der Lamina propria sind nach ½ h Relaxin-Einwirkung (Abb. 4.16 D) einige (++) Zellen, nach 1 h (Abb. 4.16 E) wenige bis einige (+-++) Zellen positiv gefärbt. Bei weiterer Zunahme der Relaxin-Einwirkzeit (2 h, Abb. 4.16 F) sind nur noch vereinzelt ((+)) positive Zellen im Stroma zu finden. Es treten in diesem Präparat die Blutgefäße mit deutlich positiver Reaktion hervor.

In der Muskelschicht finden sich jeweils nur vereinzelt ((+)) positiv angefärbte Zellen, die v.a. im perivaskulären Bindegewebe zu finden sind. Die Muskelzellen selbst sind negativ.

Insgesamt scheint eine leichte Tendenz zur graduellen Abnahme der LGR7-Expression mit steigender Einwirkungsdauer lokal applizierten Relaxins erkennbar, wobei im Präparat mit 2 h Relaxin-Einwirkung die positive Reaktion der Gefäße auffällt (siehe Tabelle 4.7 B).

4.2.2.2.3.3 Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere

In den Präparaten dieser Tiere sind ebenfalls Zellen des Epithels und der Lamina propria LGR-7-positiv angefärbt. Sie sind häufig perivaskulär zu finden. In bezug auf die positiven Zellen lässt sich lichtmikroskopisch eine unterschiedliche Ausprägung der Expression des LGR7 feststellen (siehe Tabelle 4.7 C): in Gruppe „K“ (Abb. 4.17 A) sind vereinzelte bis wenige ((+)-+) gefärbte Zellen zu erkennen; in Gruppe „E2“ (Abb. 4.17 B) sind wenige (+) LGR-7-positive Zellen vorhanden; in der Gruppe „RLX“ (Abb. 4.17 C) sind einige (++) Zellen angefärbt und in Gruppe „E2+RLX“ (Abb. 4.17 D) sind es viele (+++) Zellen, die sich ungeachtet ihrer Morphologie LGR-7-positiv darstellen.

Zusammengefasst ist im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine Tendenz zum vermehrten Auftreten des Relaxinrezeptors LGR7 im Gewebe der Zervix der mit Östradiol und v.a. der mit Relaxin behandelten Tiere zu erkennen, sowie eine weitere Erhöhung der Rezeptorexpression bei der Behandlung mit einer Kombination beider Hormone.

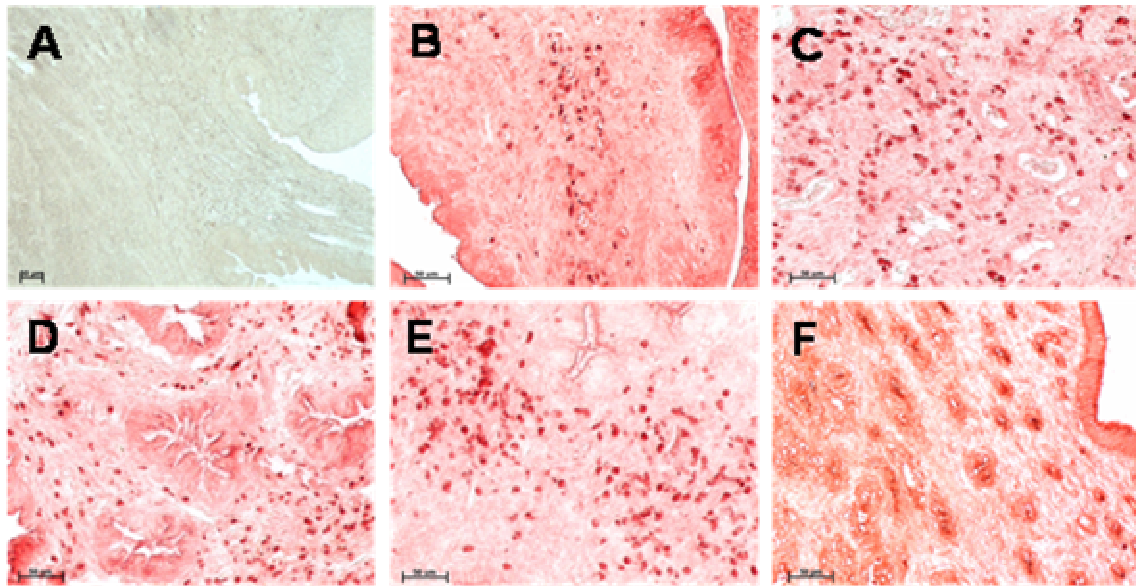


Abb. 4.16:
Immunhistochemischer Nachweis des Relaxinrezeptors (LGR7) in der Zervix intakter, zyklischer Tiere (B: späte Follikelphase, C: späte Lutealphase) sowie intakter, lokal mit Relaxin behandelter Tiere (Einwirkzeit des Relaxins: D: ½ h; E: 1 h; F: 2 h). Färbung positiver Zellen rotbraun. A: Negativkontrolle. Balken = 50 µm.

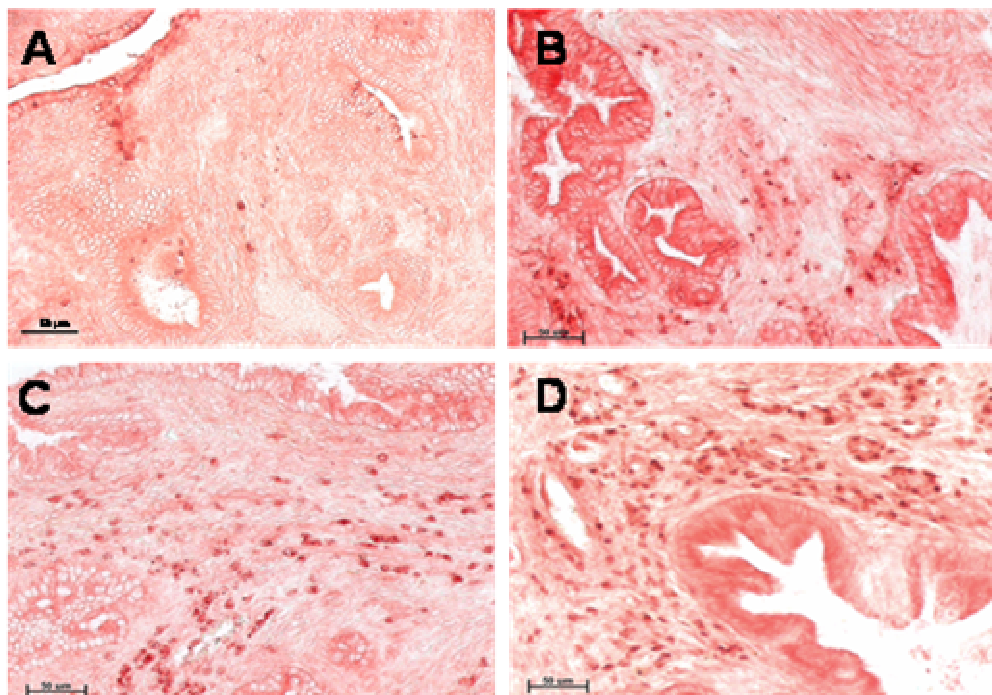


Abb. 4.17:
Immunhistochemischer Nachweis des Relaxinrezeptors (LGR7) in der Zervix ovariectomierter, systemisch hormonbehandelter Tiere. A: Kontrollgruppe ohne Hormonbehandlung, B: Behandlung mit E2, C: Behandlung mit RLX, D: Behandlung mit E2 und RLX in Kombination. Färbung positiver Zellen rotbraun. Negativkontrolle siehe Abb. 4.16 A. Balken = 50 µm.

4.2.2.2.4 Nachweis von Relaxin

4.2.2.2.4.1 Intakte, zyklische Tiere

Das Zytoplasma von Zellen sowohl des einschichtigen als auch des mehrschichtigen Epithels zeigt eine Relaxin-positive Reaktion. Die Kerne sind ungefärbt. Vor allem im mehrschichtigen Epithel sind sie als helle rund-ovale Strukturen innerhalb des gefärbten Zytoplasmas zu erkennen. In der Lamina propria sind wenige (+) Relaxin-positive Zellen zu finden. In der Tunica muscularis sind wenige (+) Muskelzellen schwach angefärbt. Vereinzelt ((+)) zeigen auch die Blutgefäßwände eine positive Reaktion (Abb. 4.18 B+C).

Die Expression des Relaxins ist im Vergleich mit der des LGR7 (siehe 4.2.2.2.3.1) geringer ausgeprägt und zeigt zudem keine Unterschiede zwischen den einzelnen Zyklusphasen (Tab. 4.7 A).

4.2.2.2.4.2 Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere

Bei den lokal mit RLX behandelten Tieren (Abb. 4.18 D-F) ist das Expressionsmuster ähnlich den intakten, zyklischen Tieren. Das Zytoplasma weniger bis einiger (++++) Epithelzellen ist in allen Präparaten positiv gefärbt, während die Zellkerne ungefärbt bleiben (siehe Abb. 4.15 F). Im Stroma sind in den Präparaten aller Gruppen nur vereinzelte ((+)) Relaxin-positive Zellen zu finden. Die Blutgefäßwände zeigen eine deutlich positive Färbung (siehe Abb. 4.18 E).

Somit ist bei diesen Tieren nach lokaler Behandlung in Abhängigkeit von der Einwirkzeit des Relaxins kein eindeutiger Unterschied im Nachweis dieses Hormons zwischen den verschiedenen Gruppen zu erkennen (Tab. 4.7 B). Es ist aber eine unterschiedliche Expression des Relaxins im Vergleich mit seinem Rezeptor (LGR7; siehe 4.2.2.2.3.2) vorhanden, wobei die Relaxin-Expression bei steigender Einwirkzeit gleich bleibt, während die Rezeptorexpression tendenziell abnimmt.

4.2.2.2.4.3 Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere

Die Färbung der Präparate entspricht im wesentlichen Erscheinungsbild denen der intakten, zyklischen Tiere. Das Zytoplasma der Epithelzellen stellt sich in allen Präparaten Relaxin-positiv dar. In der Lamina propria sind in der Kontrollgruppe wenige (+), in den anderen Gruppen (E2; RLX; E2+RLX) einige (++) Relaxin-positive Zellen zu finden. Die Zellkerne sind ungefärbt. In der Muskularis erscheinen bei allen Präparaten wenige (+) Muskelzellen schwach positiv. Weiterhin sind die Wände weniger bis einiger (++++) Blutgefäße Relaxin-positiv gefärbt (Abb. 4.19 A-D).

Um diese Beobachtungen zusammenzufassen, lässt sich sagen, dass die Ergebnisse für die einzelnen Gruppen sehr ähnlich sind. Es ist eine Relaxin-positive Färbung von Epithel-, Bindegewebe- und Muskelzellen sowie Blutgefäßen zu sehen. Es kann eine der Kontrollgruppe gegenüber leicht erhöhte Expression des Relaxins im Zervixgewebe in den drei hormonbehandelten Gruppen (E2; RLX; E2+RLX) festgestellt werden (siehe Tab. 4.7 C). Somit ist beim Relaxin ebenso wie beim LGR7 in der Kontrollgruppe eine verminderte Expression zu sehen. Unterschiede zwischen den einzelnen hormonbehandelten Gruppen (E2; RLX; E2+RLX) sind beim Relaxin selbst im Gegensatz zum LGR7 (siehe 4.2.2.2.3.3), wo die Expression v.a. nach Behandlung mit E2+RLX zunimmt, nicht zu sehen.

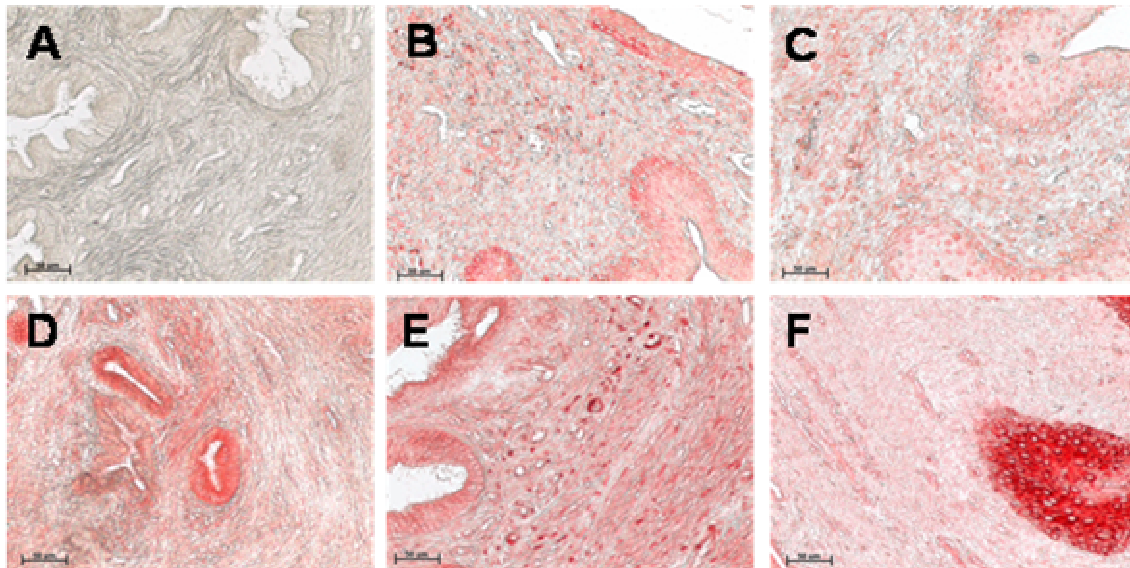


Abb. 4.18:
Immunhistochemischer Nachweis des Relaxins in der Zervix intakter, zyklischer Tiere (B: späte Follikelphase, C: späte Lutealphase) sowie intakter, lokal mit Relaxin behandelter Tiere (Einwirkzeit des Relaxins: D: ½ h; E: 1 h, F: 2 h). Färbung positiver Zellen rotbraun. A: Negativkontrolle. Balken = 50 µm.

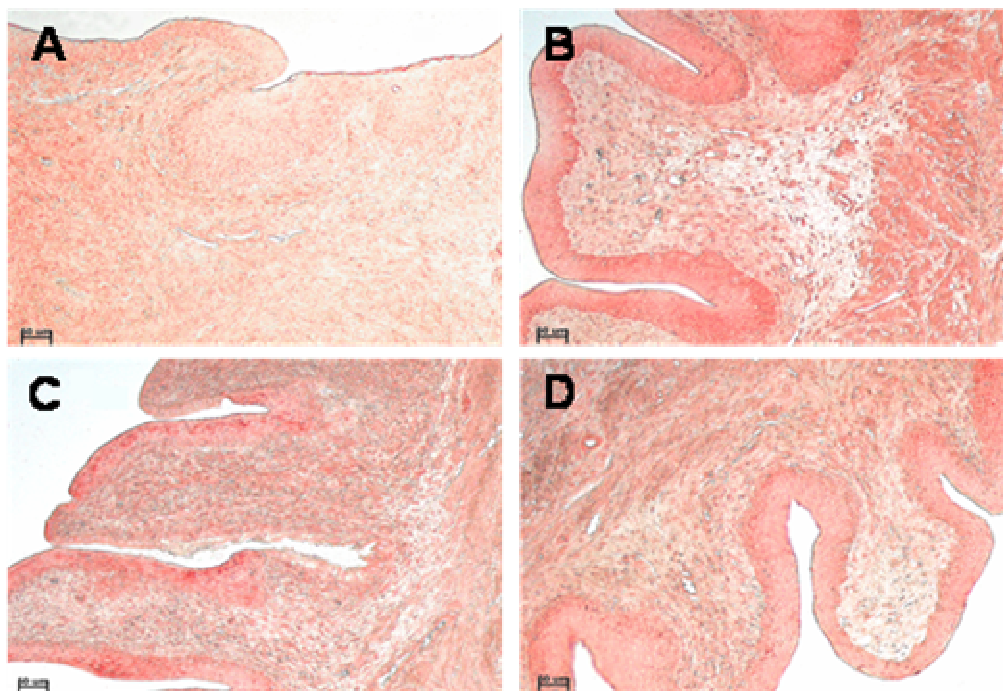


Abb. 4.19:
Immunhistochemischer Nachweis des Relaxins in der Zervix ovariectomierter, systemisch hormonbehandelter Tiere. A: Kontrollgruppe ohne Hormonbehandlung, B: Behandlung mit E2, C: Behandlung mit RLX, D: Behandlung mit E2 und RLX in Kombination. Färbung positiver Zellen rotbraun. Negativkontrolle siehe Abb. 4.18 A. Balken = 50 µm.

4.2.2.2.5 Immunhistochemische Darstellung von Aktin

Aktin ist eine Struktur, die sowohl in quergestreifter und glatter Muskulatur als auch im Gefäßendothel vorhanden ist (LEONHARDT 1990). Aus dieser Tatsache ergibt sich die Möglichkeit, auch kleine Blutgefäße durch die Nutzung spezifischer Aktin-Antikörper darstellen zu können. Durch die Aktin-Färbung sind sowohl arterielle und venöse als auch kapilläre Blutgefäße darstellbar. In die Auswertung des vorliegenden Versuchs sind, aus den unter Punkt 4.2.2 genannten Gründen, alle Gefäßtypen einbezogen und somit die gesamten Blutgefäße in den einzelnen Sichtfeldern gezählt worden. Sie wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und für jedes Präparat die durchschnittlichen Werte pro Sichtfeld bestimmt. Aufgrund einer auch bei diesem Versuch vorhandenen, relativ hohen Variabilität v.a. innerhalb der einzelnen Präparate (verschiedene Gewebeschichten), aber auch zwischen den Präparaten einer Gruppe sind hohe Standardabweichungen möglich.

4.2.2.2.5.1 Intakte, zyklische Tiere

Die Blutgefäße setzen sich durch einen positiven Aktinnachweis in der Gefäßwand deutlich vom restlichen, ungefärbten Gewebe ab (Abb. 4.20 B+C). Sie sind in der Lamina propria, zwischen den Muskelfasern und im Fettgewebe am äußeren Rand der Präparate zu finden. In der Lamina propria kommen v.a. kleine, dünnwandige Gefäße vor, während zwischen den Muskelzellen und im Fettgewebe auch vermehrt größere Gefäße zu sehen sind. Die meisten Blutgefäße sind in der späten Follikelphase zu finden ($8,17 \pm 4,4$). In der frühen Lutealphase nimmt die Anzahl der Gefäße ab ($3,96 \pm 1,68$), bevor sie in der späten Lutealphase wieder ansteigt ($6,5 \pm 3,02$; siehe Tabelle 4.4 und 4.7 A)

Tabelle 4.4: Intakte, zyklische Tiere: durchschnittliche Anzahl der Blutgefäße pro Sichtfeld (200fache Vergrößerung, jeweils 8 Sichtfelder pro Präparat); MW \pm SD

Tiergruppe	Durchschnittliche Anzahl der Blutgefäße pro Sichtfeld
Späte Follikelphase (Tag 7 FP)	$8,17 \pm 4,4$
Frühe Lutealphase (Tag 7 LP)	$3,96 \pm 1,68$
Späte Lutealphase (Tag 13/14 LP)	$6,5 \pm 3,02$

4.2.2.2.5.2 Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere

Durch Betrachtung der Präparate lokal mit Relaxin behandelter Tiere unter dem Lichtmikroskop konnte vermutet werden, dass in Präparat W357 (2h Einwirkzeit; Abb. 4.20 F) deutlich mehr Blutgefäße zu finden sind, als in den Präparaten nach $\frac{1}{2}$ bzw. 1 h (Abb. 4.20 D bzw. E).

Diese Vermutung wurde durch das Zählen der Gefäße bestätigt. Es ergaben sich folgende durchschnittliche Blutgefäßanzahlen pro Sichtfeld: bei einer Einwirkzeit von $\frac{1}{2}$ h sind bei W351 $4,79 \pm 2,07$ und W487 $5,13 \pm 1,97$ Blutgefäße pro Sichtfeld zu sehen. In der Gruppe mit 1 h Relaxin-Einwirkung konnten folgende Werte ermittelt werden: W328: $9,63 \pm 5,03$, W336: $12,13 \pm 5,74$ und W451: $7,0 \pm 2,39$ (im Mittel $9,59 \pm 2,57$) Gefäße durchschnittlich pro Sichtfeld. Für W357 (2 h Einwirkzeit) ergab das Auszählen $12,33 \pm 4,14$ Gefäße pro Sichtfeld (Tab. 4.5).

Aufgrund der zu geringen bzw. unterschiedlichen Gruppenzusammensetzungen, kann keine statistische Auswertung dieser Ergebnisse vorgenommen werden. Die Werte der Tiere mit ½ h Einwirkzeit sind aber vergleichsweise geringer als die mit 1 und 2 h Relaxin-Einwirkung. Es ist demnach eine leichte Tendenz zur Erhöhung der Blutgefäßanzahl im Zervixgewebe mit steigender Einwirkzeit des lokal applizierten Relaxins (1/2 h versus 1 bzw. 2 h) zu sehen (siehe auch Tab. 4.7 B). Diese Schwankungen in der Gefäßzahl zwischen den Tieren mit unterschiedlicher Einwirkungsdauer des Relaxins, die nicht signifikant unterschiedlich sind, könnten auch auf tierindividuelle Unterschiede zurückzuführen sein.

Tabelle 4.5: Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere: durchschnittliche Anzahl der Blutgefäße pro Sichtfeld (200fache Vergrößerung, jeweils 8 Sichtfelder pro Präparat); MW±SD

Tiernummer (Einwirkzeit)	Durchschnittliche Anzahl der Blutgefäße pro Sichtfeld
W351 (½ h)	4,79±2,07
W487 (½ h)	5,13±1,79
W328 (1 h)	9,63±5,03
W336 (1 h)	12,13±5,74
W451 (1 h)	7,0±2,39
W357 (2 h)	12,33±4,14

4.2.2.2.5.3 Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere

Es wurden wiederum Präparate aus der Kontrollgruppe (Abb. 4.21 A) und den Gruppen „E2“ (Abb. 4.21 B), „RLX“ (Abb. 4.21 C) sowie „E2+RLX“ (Abb. 4.21 D) untersucht. Durch lichtmikroskopische Betrachtung konnte eine leicht vermehrte Blutgefäßversorgung in der Gruppe „E2+RLX“ festgestellt werden. Um das Vorkommen von Blutgefäßen besser zu quantifizieren, wurde auch für diesen Versuch die durchschnittliche Blutgefäßanzahl pro Sichtfeld ermittelt und der subjektive Eindruck somit überprüft.

Aus den ermittelten Werten (Tabelle 4.6 und 4.7 C; Abbildung 4.21a) ist eine deutliche Erhöhung der Blutgefäßanzahl in der Gruppe „E2+RLX“ ersichtlich, die jedoch nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe ist.

Tabelle 4.6: Ovariectomierte und systemisch hormonbehandelte Tiere: durchschnittliche Anzahl der Blutgefäße pro Sichtfeld (200fache Vergrößerung, jeweils 8 Sichtfelder pro Präparat); MW±SD; Tiere pro Gruppe: n=3;

Tiergruppe	Durchschnittliche Anzahl der Blutgefäße pro Sichtfeld
Kontrollgruppe	6,13±2,58
Gruppe „E2“	6,07±0,57
Gruppe „RLX“	6,79±0,61
Gruppe „E2+RLX“	10,75±5,36

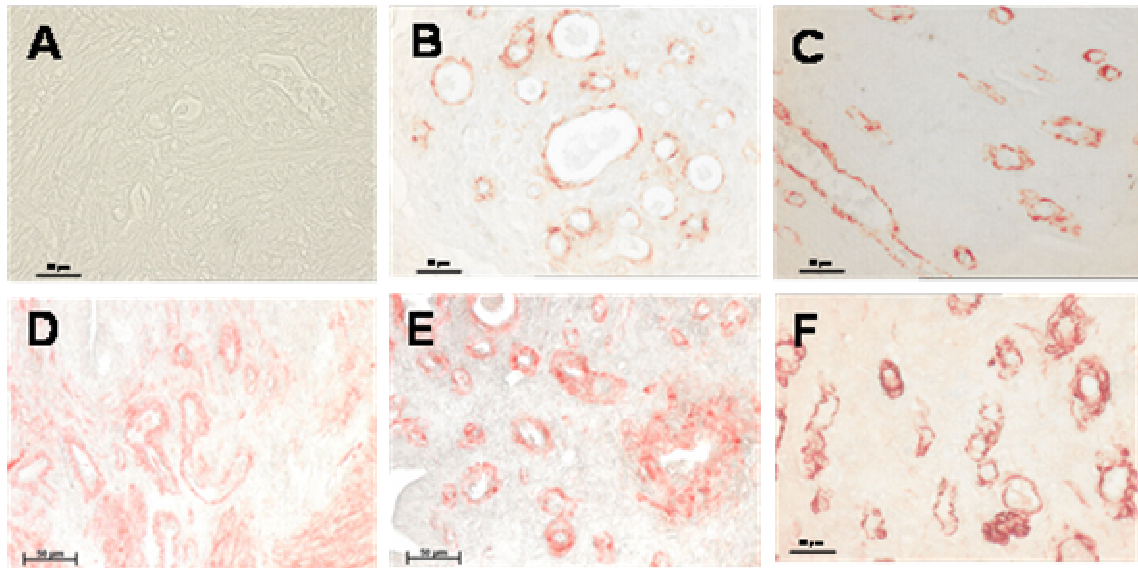


Abb. 4.20:

Immunhistochemische Darstellung der Blutgefäße mittels Aktin-Antikörpern in der Zervix intakter, zyklischer Tiere (B: späte Follikelphase, C: späte Lutealphase) sowie intakter, lokal mit Relaxin behandelter Tiere (Einwirkzeit des Relaxins: D: ½ h; E: 1 h, F: 2 h). Färbung positiver Gefäße und Muskelzellen rotbraun. A: Negativkontrolle. Balken = 50 µm.

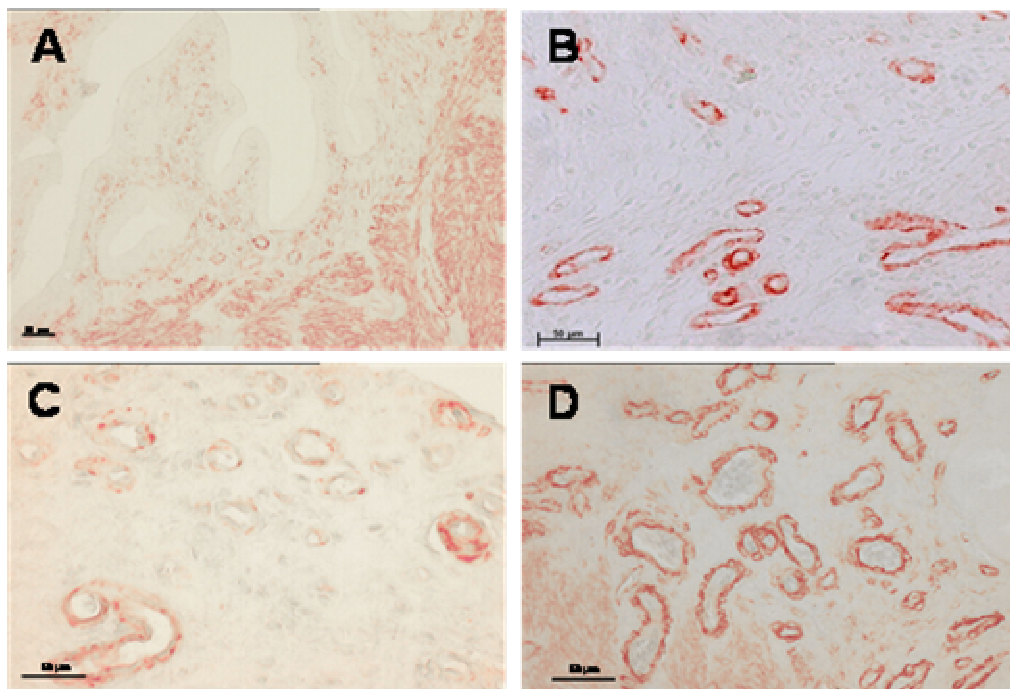


Abb. 4.21:

Immunhistochemische Darstellung der Blutgefäße mittels Aktin-Antikörpern in der Zervix ovariectomierter, systemisch hormonbehandelter Tiere. A: Kontrollgruppe ohne Hormonbehandlung, B: Behandlung mit E2, C: Behandlung mit RLX, D: Behandlung mit E2 und RLX in Kombination. Färbung positiver Gefäße und Muskelzellen rotbraun. Negativkontrolle siehe Abb. 4.20 A. Balken = 50 µm.

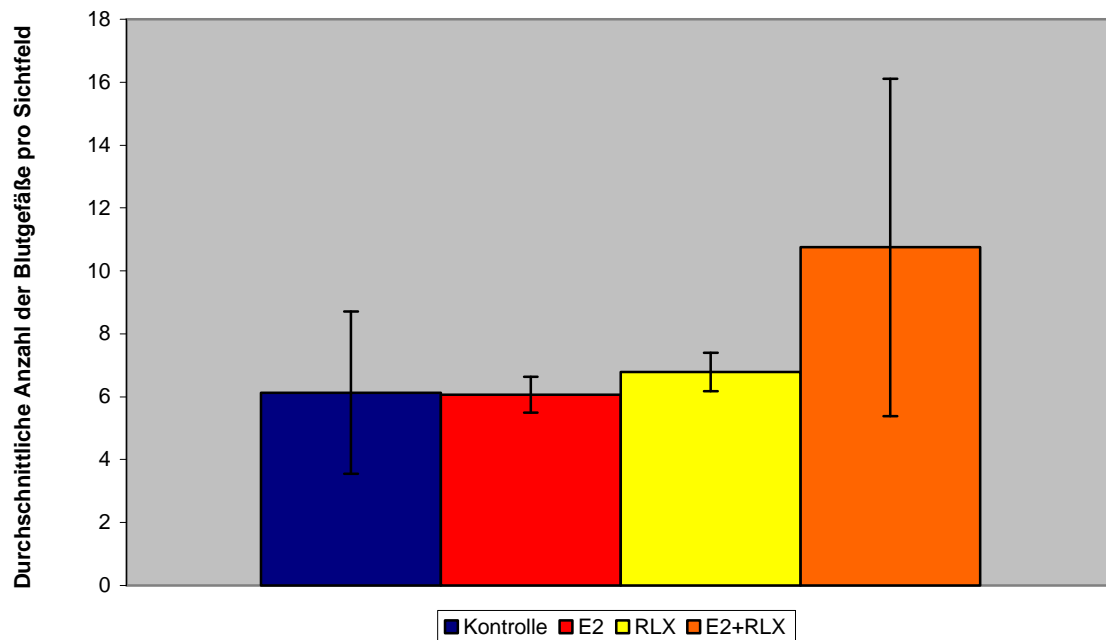


Abb. 4.21a:

Ovariectomized and systemically hormone-treated animals: average number of blood vessels per field of view (200x magnification, 8 fields of view per preparation); $MW \pm SD$; animals per group: $n=3$;

4.2.2.2.6 Immunhistochemischer Nachweis ausgewählter Matrix-Metalloproteinasen

Eine positive Reaktion in bezug auf die Darstellung der MMPs ist durch eine rotbraune Färbung des Zytoplasmas MMP-enthaltender Zellen zu erwarten. Die MMP-1 und -2 werden laut Literatur v.a. in Fibroblasten und Fibrozyten produziert, wobei die MMP-2 auch in glatten Muskelzellen nachgewiesen wurde. MMPs wie die MMP-8 oder -9 sind bisher vornehmlich in eingewanderten Zellen wie Leukozyten gefunden worden (WOESSNER u. NAGASE 2000). Durch die Gegenfärbung mit Hämalun im vorliegenden Versuch erscheinen die Zellkerne des gesamten Gewebes (auch in der Negativkontrolle) deutlich blauviolett und setzen sich somit von einer MMP-positiven, rotbraunen Reaktion des Zytoplasmas ab. In der Regel stellen sich die Zellen der Blutgefäßwände ebenfalls positiv dar. Diese Reaktion betrifft bei allen 3 nachgewiesenen MMPs (MMP-1, -2, -9) v.a. Blutgefäße, die vermutlich arteriellen Typs sind. Eine absolute Bestimmung des betroffenen Gefäßtyps ist aus den unter Punkt 4.2.2 genannten Gründen allerdings auch hier nicht möglich.

4.2.2.2.6.1 MMP-1

4.2.2.2.6.1.1 Intakte, zyklische Tiere

In den Präparaten der zyklischen Tiere (Abb. 4.22 B+C, Tab. 4.7 A) ist das Zytoplasma der Epithelzellen schwach positiv angefärbt. In Lamina propria und Muskularis stellen sich vereinzelte bis wenige (+-++) Zellen MMP-1-positiv dar. Es sind hauptsächlich Zellen mit der Erscheinungsform von Granulozyten (runde Zellen mit segmentiertem Kern) erkennbar, die wie in der H&E-Färbung (siehe 4.2.2.1.1) v.a. in der Follikelphase zu sehen sind.

4.2.2.2.6.1.2 Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere

Eine Färbung des Zytoplasmas der Epithelzellen ist in allen hier untersuchten Gruppen vorhanden. In der Lamina propria und Muskularis sind wenige (+) MMP-1-positive Granulozyten, Fibroblasten und Fibrozyten, die fokal gehäuft auftreten, sowie in einigen Präparaten auch Muskelzellen und Gefäße zu finden (Abb. 4.22 D-F). Unterschiede in der Expression der MMP-1 in Abhängigkeit von der Relaxin-Einwirkzeit (1/2 h, 1 h, 2 h) sind nicht zu erkennen (Tab. 4.7 B).

4.2.2.2.6.1.3 Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere

In der Kontrollgruppe (Abb. 4.23 A) reagiert das Zytoplasma der Epithelzellen positiv auf den Nachweis der MMP-1. In Lamina propria und Muskularis sind fokal wenige (+) MMP-1-positive Fibroblasten bzw. Fibrozyten und Granulozyten erkennbar. Vereinzelt ((+)) sind MMP-1-positive Muskelzellen zu erkennen.

In den Präparaten der Gruppe „E2“ (Abb. 4.23 B) ist das Zytoplasma der Epithelzellen MMP-1-positiv gefärbt. In der Lamina propria ist der Nachweis v.a. in Granulozyten und z.T. Fibroblasten bzw. Fibrozyten ebenfalls positiv (+++). In der Muskularis zeigen einige (+) Muskelzellen eine MMP-1-positive Reaktion.

Das Zytoplasma der Epithelzellen in den Präparaten der Gruppe „RLX“ (Abb. 4.23 C) ist ebenfalls leicht MMP-1-positiv gefärbt. In der Lamina propria und Muskularis befinden sich wenige bis einige (+++++) Zellen mit MMP-1-positiver Reaktion im Zytoplasma. Dies sind hauptsächlich Granulozyten und z.T. auch Fibroblasten bzw. Fibrozyten.

In der Gruppe „E2+RLX“ (Abb. 4.23 D) sind die Epithel- und Drüsenzellen im Zytoplasma deutlich positiv gefärbt mit teilweise sichtbaren dunkelrotbraunen Granula. In der Lamina propria sind in allen Präparaten viele (++) MMP-1-positive Granulozyten, aber auch stellenweise deutlich positive Fibroblasten bzw. Fibrozyten vorhanden. Ebenfalls in allen Präparaten sind in der Muskularis MMP-1-positiv angefärbte Muskelzellen sichtbar.

Die Blutgefäße sind in allen Gruppen (K, E2, RLX, E2+RLX) MMP-1-positiv gefärbt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine MMP-1-positive Reaktion im Epithel aller Gruppen vorhanden ist. In der Lamina propria sind v.a. die Granulozyten positiv angefärbt, so dass Unterschiede in dieser Gewebeschicht vermutlich mit der Migration dieser Zellen zusammenhängen und hier v.a. die Gruppen „E2“ und „E2+RLX“ im positiven Sinne herausragen. Auch MMP-1-positiv reagierende Muskelzellen sind v.a. in den Präparaten dieser beiden Gruppen zu finden (Tabelle 4.7 C).

Somit kann zusammengefasst werden, dass in den Gruppen „E2“ und „E2+RLX“ im Vergleich zur Kontrolle eine deutlich erhöhte Expression der MMP-1 im Gewebe der Zervix nachweisbar ist.

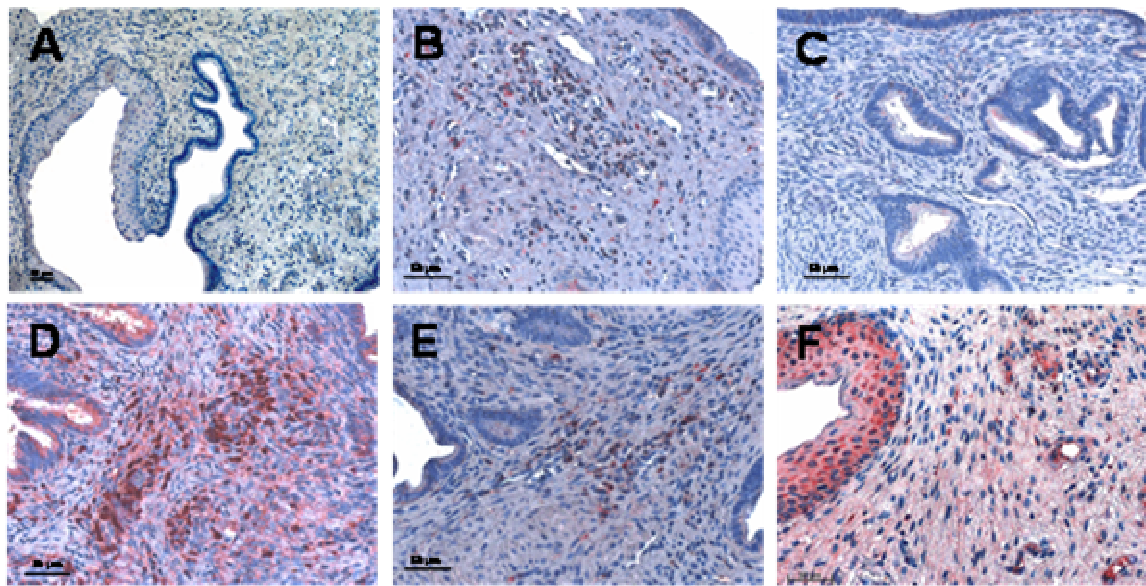


Abb. 4.22:
Immunhistochemischer Nachweis der MMP-1 in der Zervix intakter, zyklischer Tiere (B: späte Follikelphase, C: späte Lutealphase) sowie intakter, lokal mit Relaxin behandelter Tiere (Einwirkzeit des Relaxins: D: ½ h; E: 1 h, F: 2 h). Färbung positiver Zellen rotbraun, Kerne blauviolett. A: Negativkontrolle: Kernfärbung mit Hämalaun. Balken = 50 µm.

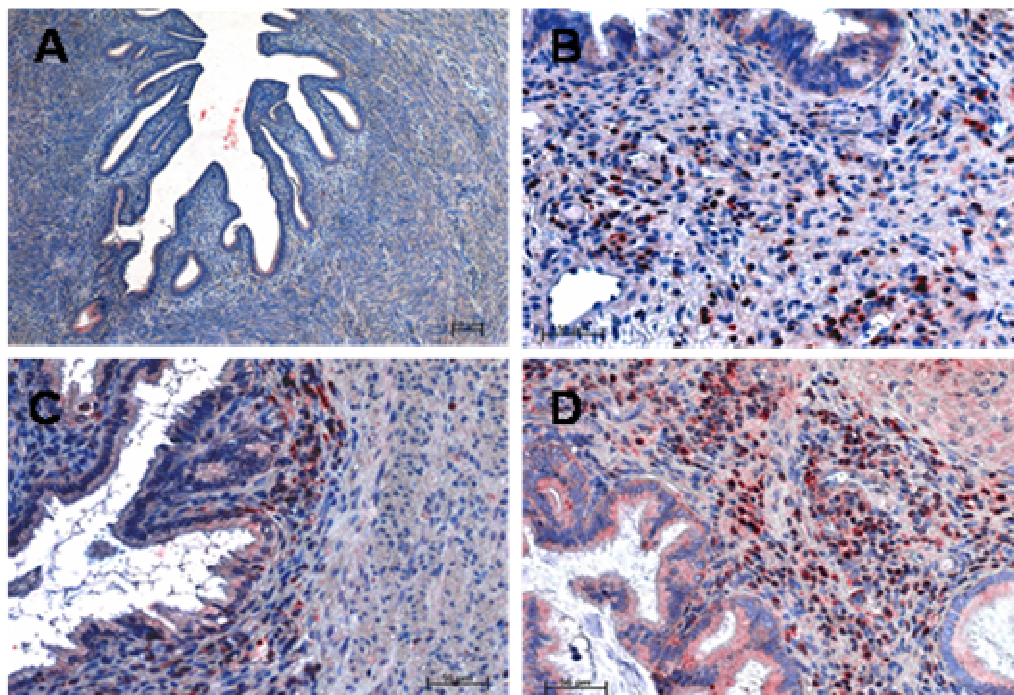


Abb. 4.23:
Immunhistochemischer Nachweis der MMP-1 in der Zervix ovariectomierter, systemisch hormonbehandelter Tiere. A: Kontrollgruppe ohne Hormonbehandlung, B: Behandlung mit E2, C: Behandlung mit RLX, D: Behandlung mit E2 und RLX in Kombination. Färbung positiver Zellen rotbraun, Kerne blauviolett. Negativkontrolle siehe Abb. 4.22 A. Balken = 50 µm.

4.2.2.2.6.2 MMP-2

4.2.2.2.6.2.1 Intakte, zyklische Tiere

In den Präparaten der zyklischen Tiere ist das Zytoplasma schwach MMP-2-positiv. In Lamina propria und Muskularis sind wenige (+) Zellen, v.a. Granulozyten, vereinzelt aber auch Fibroblasten und Fibrozyten sowie Muskelzellen MMP-2-positiv gefärbt. Die Blutgefäße stellen sich ebenfalls MMP-2-positiv dar (Abb. 4.24 B+C).

Da auch hier, wie bei der MMP-1 (siehe 4.2.2.2.6.1.1), v.a. Granulozyten gefärbt sind, liegt eine positive Reaktion v.a. in der späten Follikelphase vor (Tab. 4.7 A), wenn diese Zellen, wie schon in der H&E-Färbung (siehe 4.2.2.1.1) sichtbar, vermehrt im zervikalen Gewebe zu finden sind.

4.2.2.2.6.2.2 Lokal mit Relaxin behandelte Tiere

Für die lokal mit Relaxin behandelten Tiere ist ebenfalls ein dem MMP-1-Nachweis (siehe 4.2.2.2.6.1.2) ähnliches Ergebnis zu verzeichnen. Eine Färbung des Epithels ist in allen Gruppen vorhanden. Auch in der Lamina propria sind keine gruppenspezifischen Unterschiede zu sehen. Es sind jeweils nur wenige (+) Zellen (Fibroblasten und Fibrozyten bzw. Granulozyten) MMP-2-positiv gefärbt. Eine Färbung der Muskelzellen ist nur vereinzelt zu sehen. Die Blutgefäße zeigen auch hier in allen Präparaten eine positive Reaktion (Abb. 4.24 D-F).

Die Häufigkeit des Auftretens MMP-2-positiver Zellen in den unterschiedlichen Gewebeschichten unterscheidet sich demnach prinzipiell nicht zwischen den einzelnen Gruppen (Tab. 4.7 B). Es kann somit keine zeitabhängige Wirkung des lokal applizierten Relaxins auf die Expression der MMP-2 im Zervixgewebe nachgewiesen werden.

4.2.2.2.6.2.3 Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere

In der Kontrollgruppe (Abb. 4.25 A) erscheint das Zytoplasma der Epithel- und Drüsenzellen schwach positiv. In der Lamina propria und Muskularis sind wenige (+) Zellen MMP-2-positiv gefärbt. Diese sind sowohl Granulozyten als auch Fibroblasten bzw. Fibrozyten und vereinzelt Muskelzellen.

Die Präparate der Gruppe „E2“ (Abb. 4.25 B) weisen eine positive Färbung des Zytoplasmas von Epithel- und Drüsenzellen auf. Vor allem in der Lamina propria sind, wie beim Nachweis der MMP-1, viele (+++) Zellen (hauptsächlich Granulozyten, aber auch Fibroblasten und Fibrozyten) MMP-2-positiv. In der Muskularis sind einige (++) Muskelzellen mit einer MMP-2-positiven Reaktion zu sehen.

In der Gruppe „RLX“ (Abb. 4.25 C) weist das Zytoplasma der Epithelzellen eine MMP-2-positive Reaktion auf. In der Lamina propria und Muskularis sind wenige bis einige (++++) MMP-2-positive Zellen vorhanden. Es sind wiederum Granulozyten, Fibroblasten und Fibrozyten sowie in der Muskularis vereinzelt (+) auch Muskelzellen, die sich MMP-2-positiv darstellen.

Das Oberflächen- und Drüsenepithel der Präparate der Gruppe „E2+RLX“ (Abb. 4.25 D) ist auch in dieser Gruppe positiv gefärbt. In der Lamina propria sind in allen Präparaten viele (+++) MMP-2-positiv gefärbte Granulozyten zu sehen. Weiterhin sind vereinzelt Fibroblasten und Fibrozyten sowie in der Muskularis auch einige (++) Muskelzellen deutlich MMP-2-positiv angefärbt.

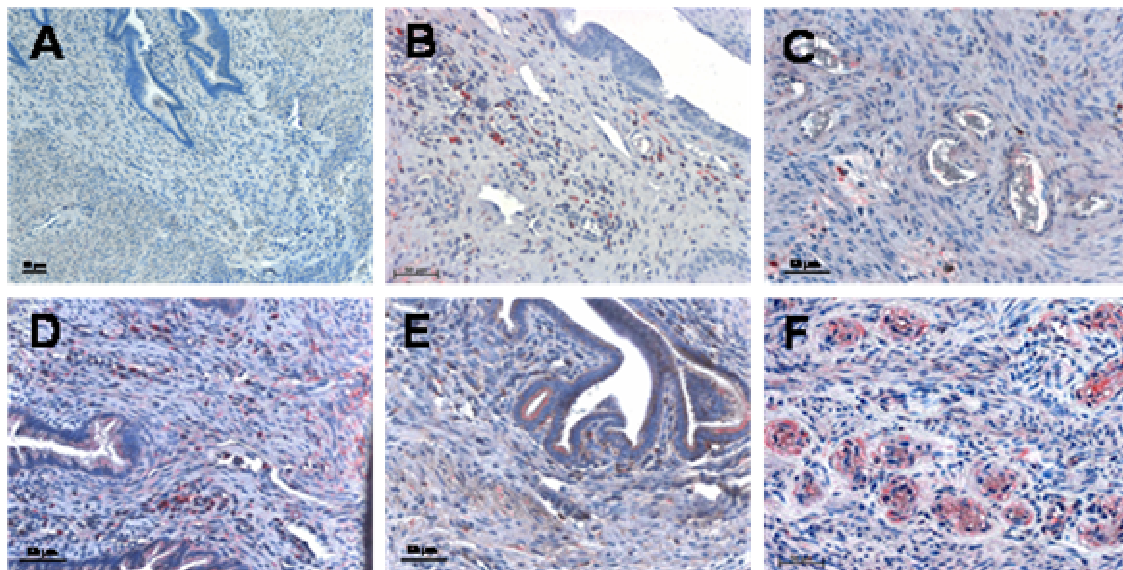


Abb. 4.24:
Immunhistochemischer Nachweis der MMP-2 in der Zervix intakter, zyklischer Tiere (B: späte Follikelphase, C: späte Lutealphase) sowie intakter, lokal mit Relaxin behandelter Tiere (Einwirkzeit des Relaxins: D: ½ h; E: 1 h, F: 2 h). Färbung positiver Zellen rotbraun, Kerne blauviolett. A: Negativkontrolle: Kernfärbung mit Hämalaun. Balken = 50 µm.

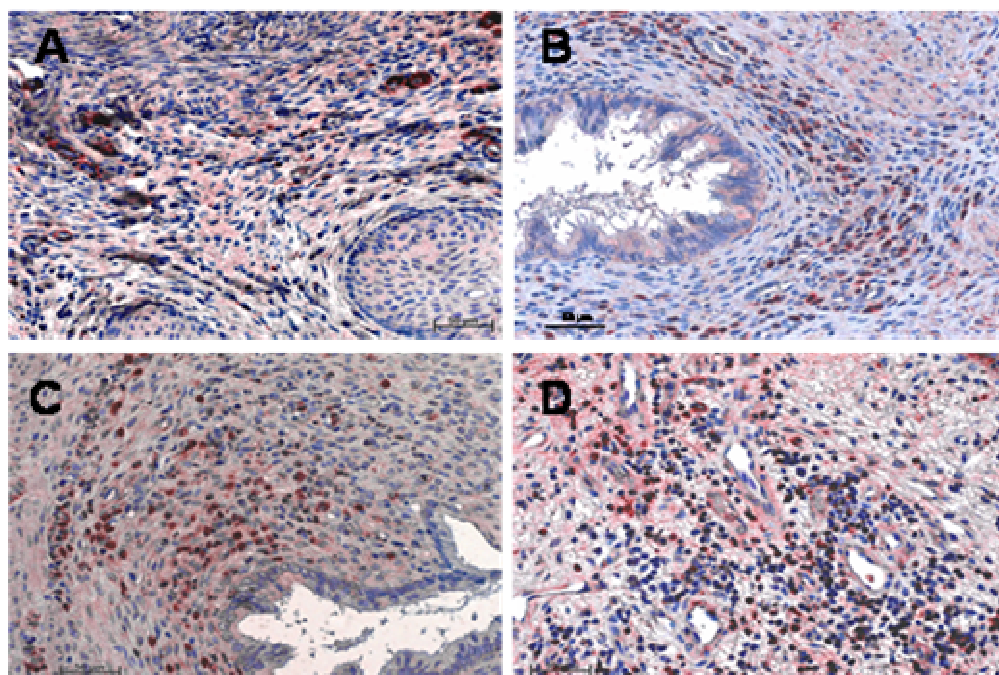


Abb. 4.25:
Immunhistochemischer Nachweis der MMP-2 in der Zervix ovariectomierter, systemisch hormonbehandelter Tiere. A: Kontrollgruppe ohne Hormonbehandlung, B: Behandlung mit E2, C: Behandlung mit RLX, D: Behandlung mit E2 und RLX in Kombination. Färbung positiver Zellen rotbraun, Kerne blauviolett. Negativkontrolle siehe Abb. 4.24 A. Balken = 50 µm.

Die Blutgefäße stellen sich in den Präparaten aller Gruppen dieses Versuchs MMP-2-positiv dar.

Zusammengefasst konnte für die MMP-2, ähnlich der MMP-1 (siehe 4.2.2.2.6.1), eine verstärkte Expression in den Zellen des Epithels, der Muskularis und v.a. der Lamina propria in den Gruppen E2 sowie E2+RLX im Vergleich mit der Kontrollgruppe dargestellt werden (Tabelle 4.7 C). Auch beim Nachweis der MMP-2 treten v.a. Granulozyten mit einem positiven Nachweis hervor, so dass wiederum ein Zusammenhang mit der Einwanderung dieser Zellen in das Gewebe denkbar ist.

4.2.2.2.6.3 MMP-9

4.2.2.2.6.3.1 Intakte, zyklische Tiere

Bei mikroskopischer Betrachtung dieser Präparate (Abb. 4.26 B+C), kann man sehen, dass v.a. die glatten Muskelzellen und die Blutgefäße deutlich positiv reagieren. Das Zytoplasma der Epithelzellen ist negativ bis schwach positiv. In der Lamina propria sind stark vereinzelt ((+)) positive, fibroblasten- bzw. fibrozytenartige Zellen zu finden. Es fällt auf, dass im Gegensatz zum Nachweis der MMP-1 bzw. MMP-2 (siehe 4.2.2.2.6.1.1 bzw. 4.2.2.2.6.2.1) keine positiven Granulozyten zu finden sind. Die Blutgefäße zeigen auch hier wie beim Nachweis der MMP-1 und -2 in allen Präparaten eine positive Reaktion. Insgesamt ist kein Unterschied in der Expression der MMP-9 in Follikel- und Lutealphase zu verzeichnen (Tab. 4.7 A).

4.2.2.2.6.3.2 Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere

Eine Färbung des Zytoplasmas der Epithelzellen ist in allen untersuchten Präparaten zu finden, wobei v.a. Drüsenzellen und Zellen des hochprismatischen Epithels MMP-9-positiv sind. Das Gewebe der Lamina propria ist negativ. In der Muskularis zeigen wenige (+) Muskelzellen eine deutliche MMP-9-positive Reaktion. Die Blutgefäße sind auch hier in allen Gewebeschichten positiv angefärbt (Abb. 4.26 D-F).

Unterschiede in der Expression der MMP-9 sind in Abhängigkeit von der Relaxin-Einwirkzeit (1/2 h, 1 h, 2 h) nicht zu erkennen (Tab. 4.7 B).

4.2.2.2.6.3.3 Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere

In den Präparaten aller Gruppen dieses Versuchs (K, E2, RLX, E2+RLX; Abb. 4.27 A-D, Tab 4.7 C) zeigt das Zytoplasma der Epithelzellen eine schwach MMP-9-positive Reaktion. In der Lamina propria sind jeweils nur vereinzelt ((+)) positive Zellen zu finden. Als solche sind v.a. Fibroblasten bzw. Fibrozyten erkennbar. In der Muskelschicht stellen sich viele (+++) Muskelzellen deutlich MMP-9-positiv dar. Die Blutgefäße erscheinen jeweils deutlich MMP-9-positiv gefärbt. Eine MMP-9-positive Reaktion der Granulozyten ist im Gegensatz zur Darstellung der MMP-1 bzw. -2 (siehe 4.2.3.2.2.1.3 bzw. 4.2.2.2.6.2.3) nicht nachweisbar.

Zusammengefasst sind beim Nachweis der MMP-9 keine Unterschiede in der Expression des Enzyms zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen hormonbehandelter Tiere (E2; RLX sowie E2+RLX) zu finden.

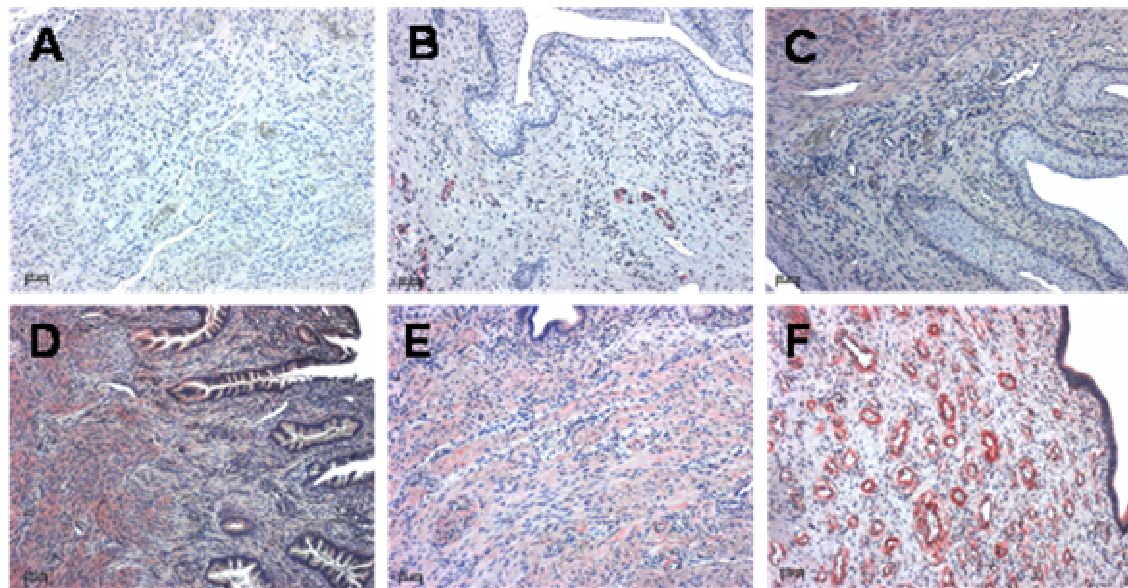


Abb. 4.26:
Immunhistochemischer Nachweis der MMP-9 in der Zervix intakter, zyklischer Tiere (B: späte Follikelphase, C: späte Lutealphase) sowie intakter, lokal mit Relaxin behandelter Tiere (Einwirkzeit des Relaxins: D: ½ h; E: 1 h, F: 2 h). Färbung positiver Zellen rotbraun, Kerne blauviolett. A: Negativkontrolle: Kernfärbung mit Hämalaun. Balken = 50 µm.

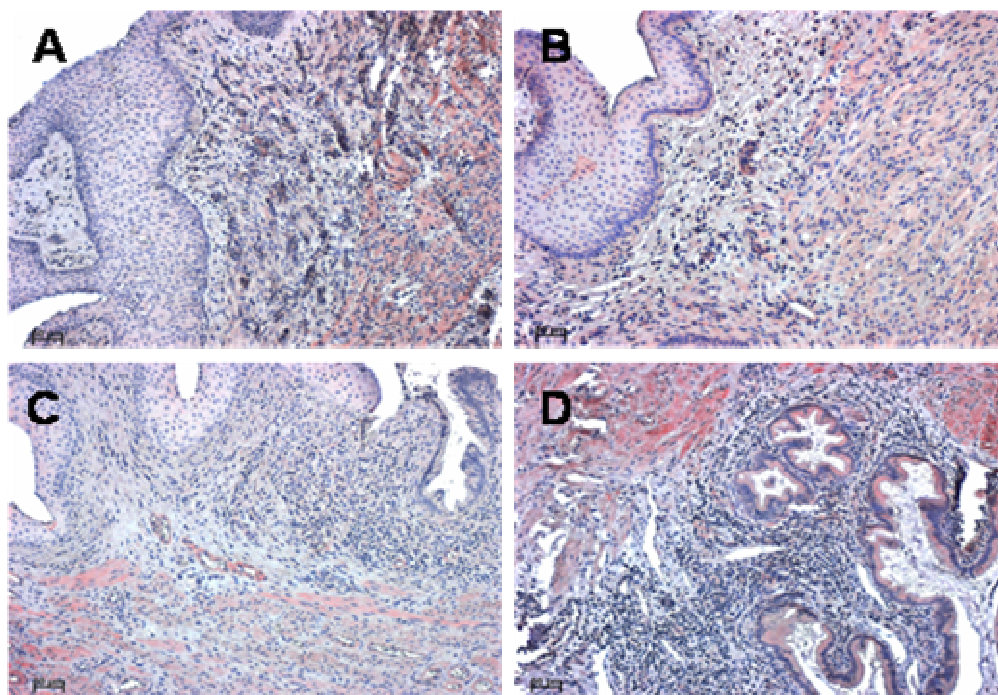


Abb. 4.27:
Immunhistochemischer Nachweis der MMP-9 in der Zervix ovariectomierter, systemisch hormonbehandelter Tiere. A: Kontrollgruppe ohne Hormonbehandlung, B: Behandlung mit E2, C: Behandlung mit RLX, D: Behandlung mit E2 und RLX in Kombination. Färbung positiver Zellen rotbraun, Kerne blauviolett. Negativkontrolle siehe Abb. 4.26 A. Balken = 50 µm.

Tabelle 4.7: Zusammenfassende semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Nachweise im Gewebe von: A: intakten, zyklischen Tieren (sFP, fLP, sLP), B: intakten, lokal mit RLX behandelten Tieren (Einwirkzeit: ½ h, 1 h bzw. 2 h) und C: ovariectomierten, systemisch hormonbehandelten Tieren (Gruppen: K, E2, RLX, E2+RLX)

Tiere	ER	PR	HSD7	LGR7	RLX	Aktin	MMP-1	MMP-2	MMP-9
A									
sFP									
Ep	+++	+++	-	++	(+)		(+)	(+)	(+)
LP	+++	+++	-	++	+	++	+	++	(+)
Mm	+++	+++	-	-	+	(8)	+	+	+
Gef	-	-	+	-	(+)		+	-	+
fLP									
Ep	+++	+++	-	+	(+)		(+)	(+)	(+)
LP	+++	+++	-	+	+	(+)	(+)	+	(+)
Mm	+++	+++	-	-	+	(4)	(+)	+	+
Gef	-	-	+	-	(+)		+	-	+
sLP									
Ep	+++	+++	-	+++	(+)	+	(+)	(+)	(+)
LP	+++	+++	-	+++	+	(7)	(+)	+	(+)
Mm	+++	+++	-	-	+		(+)	+	+
Gef	-	-	+	-	(+)		+	(+)	+
B									
1/2h									
Ep	+++	++	+	(+)	+		+	+	+
LP	+++	++	-	++	(+)	+	+	+	-
Mm	+++	++	-	-	(+)	(5)	(+)	(+)	+
Gef	-	-	+	-	+		+	(+)	+
1h									
Ep	+++	++	+	(+)	+		+	+	+
LP	+++	++	-	+++	(+)	++	+	+	-
Mm	+++	++	-	-	(+)	(9)	(+)	(+)	+
Gef	-	-	+	-	+		+	(+)	+
2h									
Ep	+++	++	+	(+)	+		+	+	+
LP	+++	++	-	(+)	(+)	+++	+	+	-
Mm	+++	++	-	-	(+)	(12)	(+)	(+)	+
Gef	+	+	+	-	+		+	+	++
C									
K									
Ep	+++	+++	+	(+)	(+)		+	+	++
LP	+++	+++	-	(+)	(+)	+	+	+	(+)
Mm	+++	+++	-	-	+	(6)	(+)	(+)	+++
Gef	-	(+)	+	-	+		+	+	+
E2									
Ep	+++	+++	+	+	+		+	+	++
LP	+++	+++	-	+	++	+	+++	+++	(+)
Mm	+++	+++	-	-	+	(6)	++	++	+++
Gef	-	(+)	+	-	+		+	+	+
RLX									
Ep	+++	+++	+	++	+		+	+	++
LP	+++	+++	-	++	++	(7)	+++	+++	(+)
Mm	+++	+++	-	-	+		+	(+)	+++
Gef	-	(+)	+	-	+		+	+	+
E2+RLX									
Ep	+++	+++	+	+++	+		+	+	++
LP	+++	+++	-	+++	++	+++	+++	+++	(+)
Mm	+++	+++	-	-	+	(11)	++	++	+++
Gef	-	(+)	+	(+)	++		+	+	+

Nachweis des Östradiolrezeptors (ER), Progesteronrezeptors (PR), der 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-7 (HSD7), des Relaxinrezeptors (LGR7), des Relaxins (RLX), des Aktins in den Gefäßwänden (Anzahl der ausgezählten Gefäße), sowie der MMPs 1,2+9 in zervikalem Gewebe (Ep: Epithel, LP: Lamina propria, Mm: Muskelzellen, Gef: Blutgefäßwände); Auswertung: - = keine positive Reaktion; (+) = nur vereinzelt auftretende positive Zellen, <10%; + = wenig positive Zellen, ca. 10-40%; ++ = einige positiv gefärbte Zellen, ca. 40-70%; +++ = viele Zellen mit positiver Reaktion, >70%.

4.2.3 Molekularbiologische Untersuchungen

Zur Ergänzung der immunhistochemischen Ergebnisse wurde zervikales Gewebe sowohl von den intakten, zyklischen als auch von den lokal und systemisch hormonbehandelten Weißbüschelaffen mittels RT-PCR auf die Expression der Steroidrezeptoren (ER α , PR), des Relaxins (RLX) und des Relaxinrezeptors (LGR7) sowie des VEGF auf mRNA-Ebene untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 4.28 zusammengefasst. Positive Signale sprechen für das Vorhandensein einer entsprechenden mRNA-Expression. Das Fehlen eines Signals bedeutet entweder eine zu schwache, nicht nachweisbare oder eine nicht vorhandene Expression. Ein negatives Ergebnis durch fehlerhafte oder geschädigte mRNA kann ausgeschlossen werden, da durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte sowie Analyse der mRNA im Agarosegel eine quantitative sowie qualitative Beurteilung der gewonnenen mRNA möglich war. Weiterhin wurde die Eignung der aus der mRNA gebildeten cDNA durch den 18S-rRNA-Nachweis mittels RT-PCR überprüft.

4.2.3.1 Intakte, zyklische Tiere

Bei den Tieren in physiologischer Situation (Abb. 4.28 A) ergab der Nachweis des ER α starke Transkriptionssignale in allen Zyklusphasen (sFP: späte Follikelphase; fLP: frühe Lutealphase; sLP: späte Lutealphase). Beim Nachweis des PR war in der frühen Lutealphase nur ein schwaches Signal vorhanden. Insgesamt kann gesagt werden, dass mRNA-Signale von beiden Steroidrezeptoren sowohl in der späten Follikel- als auch in der frühen und späten Lutealphase vorhanden sind. Der immunhistochemische Nachweis der Expression des ER α und des PR auf Proteinebene (siehe 4.2.2.2.1.1 bzw. 4.2.2.2.1.2) zeigt, dass die auf mRNA-Ebene vorhandene Information offenbar in ein Protein übersetzt wird (Translation). Es ist davon auszugehen, dass der jeweilige Rezeptor im Gewebe vorliegt, wo er mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden konnte.

Der Nachweis von Transkripten des Relaxinrezeptors LGR7 zeigt mRNA-Signale in der späten Follikel- sowie späten Lutealphase. Das bestätigt die immunhistochemischen Ergebnisse (siehe 4.2.2.2.3.1), wo die Expression des Rezeptorproteins in diesen beiden Zyklusabschnitten ebenfalls am stärksten ausgeprägt ist.

Für RLX selbst sind schwache Signale auf mRNA-Ebene ebenfalls in später Follikel- sowie später Lutealphase vorhanden und bestätigen eine entsprechende Expression auf Proteinebene (siehe 4.2.2.2.4.1).

VEGF-mRNA konnte in der späten Follikel- sowie späten Lutealphase nachgewiesen werden. In der Follikelphase ist das Signal besonders stark ausgeprägt. Die Expression des VEGF auf mRNA-Ebene korreliert mit der immunhistochemisch ermittelten Gefäßanzahl im Gewebe dieser Tiere (siehe 4.2.2.2.5.1). Die größte Anzahl von Gefäßen konnte hier in der späten Follikelphase festgestellt werden. Die Anzahl der Blutgefäße in der späten Lutealphase war geringer als in der Follikelphase, die geringste Anzahl an Gefäßen war in der frühen Lutealphase zu finden.

4.2.3.2 Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere

Bei diesen Tieren (Abb. 4.28 B) ist für den Nachweis von ER α -mRNA ein einheitlich starkes Signal vorhanden, so dass man davon ausgehen kann, dass der Östradiolrezeptor in allen Präparaten unabhängig von der Relaxin-Einwirkzeit exprimiert wird. Beim Nachweis des PR treten jedoch Unterschiede in der Expression auf: nach ½ bzw. 1 h Relaxineinwirkung ist jeweils 1 positives und einmal kein Signal vorhanden. Somit sind individuelle Unterschiede in der Expression des PR zu sehen, jedoch keine zwischen den einzelnen Gruppen. Dementsprechend konnte für ER α und PR auch immunhistochemisch (4.2.2.2.1.1.2 bzw. 4.2.2.2.1.2.2) eine Expression der ER α - und PR-Rezeptorproteine in allen Präparaten unabhängig von der Einwirkzeit des applizierten Relaxins nachgewiesen werden.

Für den Nachweis des LGR7 auf mRNA-Ebene verhält es sich wie für den PR: es ist nach ½ bzw. 1 h Relaxin-Einwirkung jeweils nur ein schwach positives Signal vorhanden. Somit kann auch auf Transkript-Ebene in Übereinstimmung mit der Immunhistochemie (siehe 4.2.2.2.3.2) keine Unterscheidung in der Expression des LGR7 zwischen den beiden Gruppen gemacht werden.

Eine Expression von Relaxin-mRNA konnte nicht nachgewiesen werden. Auf Proteinebene konnte in der Immunhistochemie (siehe 4.2.2.2.4.2) allerdings eine schwache Expression des Relaxins nachgewiesen werden, was in der Diskussion erörtert werden soll.

Nach lokaler Relaxinapplikation kann sowohl nach ½ als auch nach 1 h keine VEGF-mRNA nachgewiesen werden. Durch die immunhistochemische Färbung konnte ein tendenzieller Anstieg der durchschnittlichen Gefäßanzahl in der Gruppe mit 1 h Relaxin-Einwirkzeit gegenüber ½ h ermittelt werden (siehe 4.2.2.2.5.2), womit eine vasoaktive Wirkung des lokal applizierten Relaxins als möglich erachtet werden kann, obwohl zum Versuchszeitpunkt keine VEGF-Expression auf Transkript-Ebene bei lokaler Einwirkung des Relaxins nachgewiesen werden konnte.

4.2.3.3 Ovariectomierte, systemisch hormonbehandelte Tiere

Auch bei diesen Tieren (Abb. 4.28 C) wird ER α -mRNA in allen untersuchten Organen exprimiert. Bei den Kontrolltieren (K) und in der Gruppe „E2+RLX“ ist eine einheitlich starke Expression nachweisbar. In den Gruppen „E2“ und „RLX“ ist die Signalstärke jedoch unterschiedlich. Der Nachweis des PR ergab ein ähnliches Ergebnis wie der des ER α , wobei hier in den Gruppen „E2“ und „RLX“ in jeweils 2 Organen kein Signal zu sehen ist. Eine gleichmäßig starke Expression beider Steroidrezeptoren in allen untersuchten Organen einer Gruppe tritt nur nach Behandlung mit Östradiol und Relaxin in Kombination („E2+RLX“) auf. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Transkripte der Steroidrezeptoren ER α und PR trotz individueller Unterschiede in der Expression in allen Gruppen einschließlich Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnten. Somit entspricht das Vorhandensein von ER α - und PR-Transkripten der immunhistochemisch für beide Steroidrezeptoren nachgewiesenen Expression der Rezeptorproteine im Gewebe (siehe 4.2.2.2.1.1.3 bzw. 4.2.2.2.1.2.3).

Der Nachweis des Relaxinrezeptors LGR7 ergab in der Kontrollgruppe überwiegend stark positive Signale. In der Gruppe der mit E2 behandelten Tiere sind ein starkes sowie ein schwaches Signal vorhanden und damit ist bei der Hälfte der untersuchten Tiere eine LGR7-mRNA-Expression nachweisbar. Nach Behandlung mit RLX ist der Nachweis des LGR7 in der Mehrzahl der untersuchten Organe positiv, wobei nach der kombinierten Behandlung mit

E2+RLX insgesamt nur noch ein positives Signal vorhanden und damit die Mehrzahl der Nachweise negativ ist. Auch wenn innerhalb einer Gruppe jeweils positive und negative Signale zu sehen sind, ist eine vermehrte LGR7-Gen-Expression in der Gruppe der mit Relaxin allein behandelten Tiere zu finden. In dieser Gruppe konnte auch immunhistochemisch (siehe 4.2.2.2.3.3) eine vermehrte Expression des LGR7-Rezeptorproteins festgestellt werden, wobei die Gruppe „E2+RLX“ den stärksten positiven Nachweis zeigte.

Beim Nachweis des RLX ist in der Kontrollgruppe sowie in den Gruppen „E2“ und „E2+RLX“ jeweils nur bei einem der untersuchten Tiere ein schwaches Signal vorhanden. Somit konnte für die Mehrheit der untersuchten Zervices dieser Gruppen keine Expression von Relaxin-mRNA-Transkripten nachgewiesen werden. In der Gruppe „RLX“ ist der Nachweis bei der Mehrzahl der untersuchten Organe positiv, wobei nur ein stark positives Signal vorhanden ist. Immunhistochemisch (siehe 4.2.2.2.4.3) konnte eine schwache Expression des Relaxins in allen Gruppen nachgewiesen werden, während das auf mRNA-Ebene jedoch nur für die Gruppe „RLX“ möglich war.

Der Nachweis von Transkripten des VEGF ergab mehrheitlich positive Signale in der Kontrollgruppe sowie jeweils in der Mehrzahl der untersuchten Organe negative Ergebnisse für die Gruppen „E2“ und „RLX“. Eine in allen untersuchten Zervices einer Gruppe auftretende Expression ist nur in der Gruppe der mit E2+RLX in Kombination behandelten Tiere zu sehen. Sie korreliert mit der immunhistochemisch durch Auszählung der Aktin-positiven Gefäße ermittelten erhöhten Anzahl an Blutgefäßen, die ebenfalls nur in dieser Gruppe auftritt (siehe 4.2.2.2.5.3).

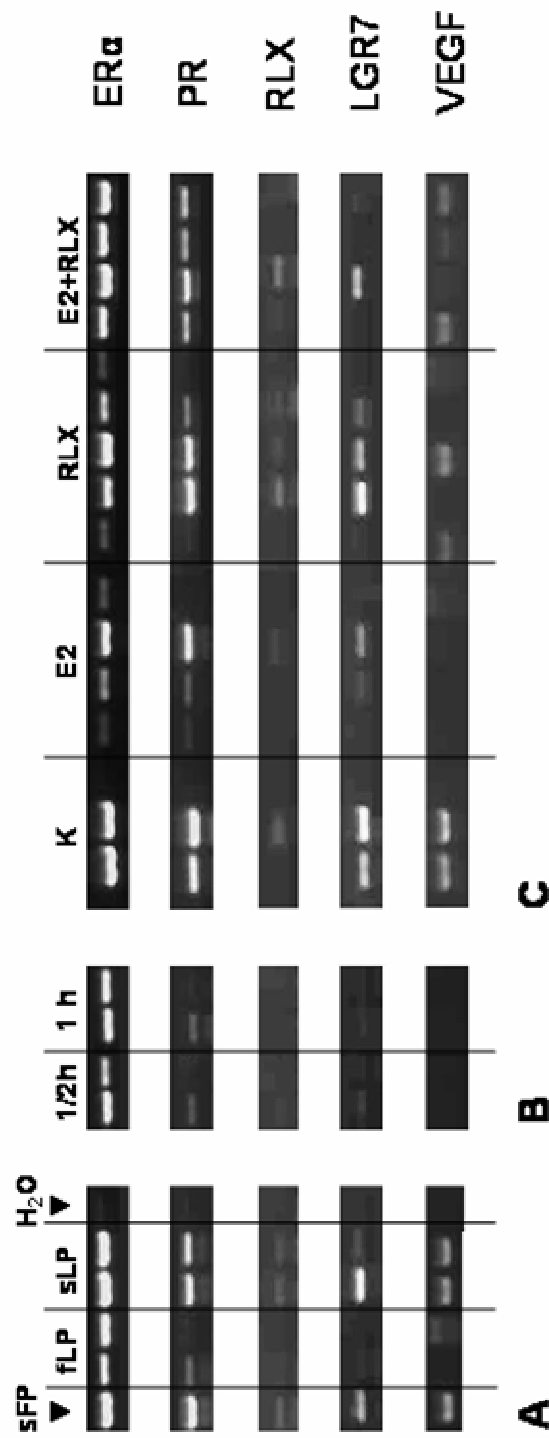


Abb. 4.28:
Darstellung der Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen (RT-PCR) zum Nachweis des Östrogenrezeptors α (ER α), des Progesteronrezeptors (PR), des Relaxins (RLX), des Relaxinrezeptors (LGR7) und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF).
A: Intakte, zyklische Tiere (sFP: späte Follikelphase; fLP: frühe Lutealphase; sLP: späte Lutealphase), H₂O: Negativkontrolle für A, B und C
B: Intakte, lokal mit Relaxin behandelte Tiere, Einwirkzeit des Relaxins 1/2 h bzw. 1 h
C: ovariectomisierte, systemisch hormonbehandelte Tiere (K: Kontrollgruppe; E2: Behandlung mit 17 β -Östradiol; RLX: Behandlung mit Relaxin; E2+RLX: Behandlung mit einer Kombination aus 17 β -Östradiol und Relaxin)

5 Diskussion

Die Wirkung des Peptidhormons Relaxin auf den weiblichen Reproduktionstrakt wird schon seit längerer Zeit kontrovers diskutiert. Ein Großteil der Forschung auf diesem Gebiet wurde durch Untersuchungen an Nagetieren und Schweinen durchgeführt. Sie bezieht sich v.a. auf das Ovar und den Uterus. Aufgrund unterschiedlicher durch die systemische Relaxin-Zirkulation hervorgerufener Hormonprofile während der Gravidität beim Menschen im Vergleich mit Nager und Schwein bestand zeitweise die Auffassung, dass Relaxin im humanen Reproduktionstrakt nicht die gleichen Wirkungen entfaltet, wie diese an den genannten Tiermodellen nachgewiesen worden sind (BRENNAND et al. 1997; PETERSEN et al. 1995). Diese Wirkungen beziehen sich v.a. auf einen remodulierenden Einfluss des Relaxins auf das Bindegewebe der Zielorgane, speziell des Reproduktionstraktes.

Der Zervix kommt als kaudalem Anteil des Uterus während der Gravidität und Geburt eine besondere Rolle im Reproduktionstrakt zu. Diese beruht auf den gegenteiligen Mechanismen des Verschlusses der Zervix während der gesamten Gravidität einerseits und der schnellen Öffnung und Erweiterung zum Zeitpunkt der Geburt andererseits (LEPPERT 1995; DANFORTH 1983). Bei der hormonellen Regulation der im Bindegewebe ablaufenden, strukturverändernden Vorgänge spielt zum Zeitpunkt der Geburt neben Relaxin auch Östradiol eine wichtige Rolle. In der Literatur ist wenig Information über strukturelle Veränderungen in der Zervix des Primaten (einschließlich Mensch) aufgrund der Hormoneinwirkung zu finden. Nach neusten Erkenntnissen über eine lokale Synthese und Wirkung des Relaxins in verschiedenen Teilen des Reproduktionstraktes (z.B. Endometrium bzw. Dezidua und Plazenta) sowie nicht-reproduktiven Organen (z.B. Herz, Lunge, Niere - BATHGATE et al. 2003; DU et al. 2003; SAMUEL et al. 2003b; DSCHIETZIG et al. 2001; GARBER et al. 2001) wurde auch die Rolle des Relaxins beim Menschen zum Zeitpunkt der Geburt neu diskutiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neben der Erhebung physiologischer Daten zu zyklischen Veränderungen in der Zervix des Weißbüschelaffen, einen möglichen erweichenden Effekt des Relaxins auf das Gewebe der Zervix dieser Primatenspezies sowohl nach lokaler als auch nach systemischer Applikation zu untersuchen und einen Überblick über die Veränderungen im Gewebe dieses Organs zu erarbeiten. Dazu wurden verschiedene *in vivo*- und *in vitro*-Versuche durchgeführt. Um die Wirkungen des Relaxins einordnen zu können, wurden weiterhin zum Vergleich die systemischen Wirkungen des Östradiols sowie ein möglicher Kombinationseffekt beider Hormone auf die Zervix untersucht.

5.1 Physiologische Situation

Um zuerst einen Überblick über die physiologischen Gegebenheiten in der Zervix des Weißbüschelaffen zu erhalten, wurden Organe von Tieren aus der Follikel- und Lutealphase untersucht. Diese Daten sollen als „Normalwerte“ für den Vergleich mit den an den hormonbehandelten Tieren erarbeiteten Ergebnissen zur Verfügung stehen.

Der Zyklus beim Weißbüschelaffen dauert durchschnittlich 28 Tage (FRASER u. LUNN 1999; TORII 1987; HEARN 1983). Dabei beträgt die Länge der Follikelphase 8-10, die der Lutealphase 18-20 Tage (EINSPANIER et al. 1999; FRASER u. LUNN 1999; NUBBE-

MEYER et al. 1997; HEARN 1983). Histologisch konnten in der vorliegenden Arbeit in der späten Follikelphase (Tag 7 FP) beim Weißbüschelaffen eine deutliche Sekretion des hochprismatischen Epithels sowie das Auftreten von Eosinophilen nachgewiesen werden. Das hochprismatische Epithel ist für diese Zyklusphase typisch (LINDZEY u. KORACH 1999). Nach MOGHISSI (1999) bzw. KOCH u. BERG (1990) erreicht das Zervixepithel kurz vor der Ovulation einen Zustand maximaler Sekretion eines wässrigen, wenig viskösen Sekrets. Eine Einwanderung von Abwehrzellen in die Zervix wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben. RAMOS et al. (2000) haben während des Zyklus eine Östrogen-induzierte und Progesteron-gehemmte eosinophile Invasion in der Zervix der Ratte festgestellt, welche ebenfalls in der Spätgravidität auftrat. ROBERTSON et al. (1996) konnten in uterinen Epithelzellkulturen des Östrus eine vermehrte Produktion des Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktors, der chemotaktisch auf die entsprechenden Abwehrzellen wirkt, nachweisen. Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression der Matrix-Metalloproteinasen, die im Zusammenhang mit einer Geweberemodulierung stehen, untersucht. Die MMP-1 und -2 treten vorrangig in der späten Follikelphase auf. Bei beiden Nachweisen erscheinen v.a. Granulozyten positiv, womit eine erhöhte MMP-1- bzw. MMP-2-Expression wahrscheinlich v.a. durch den Östrogen-bedingten Anstieg der Anzahl eingewanderter Abwehrzellen bedingt wird. Nach RATH et al. (1994) bzw. MAUL et al. (2002) enthalten die Granula der Granulozyten Matrix-Metalloproteinasen (Kollagenasen und andere Proteinasen). Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der eingewanderten Granulozyten und dem Ausmaß der Kollagenolyse (JUNQUEIRA et al. 1980). Warum in den durchgeführten Versuchen die MMP-1 und MMP-2 v.a. in den Granulozyten und weniger in Fibroblasten bzw. Fibrozyten nachweisbar sind, ist bis jetzt ungeklärt. Allerdings konnten STYGAR et al. (2002) neben einem Vorherrschen des MMP-2-Nachweises in Fibroblasten ebenso Leukozyten und glatte Muskelzellen als Quelle für diese MMPs nachweisen. Für die MMP-9 ist in der vorliegenden Untersuchung keine stärkere Expression in der Follikelphase zu verzeichnen. Sie konnte in der vorliegenden Arbeit entgegen den durch die Literaturstudien geweckten Erwartungen, nicht in den Abwehrzellen, sondern v.a. in der Muskulatur nachgewiesen werden. Bei STYGAR et al. (2002) finden sich allerdings auch Hinweise auf einen Nachweis dieser MMP neben den Abwehr- auch in den Epithel- und Stromazellen. Im Zusammenhang mit den in den eigenen Untersuchungen beim Weißbüschelaffen in der Follikelphase beschriebenen Parametern (Zellinvasion, erhöhte Expression von MMPs) war in den für diese Arbeit untersuchten Präparaten eine Auflockerung der Extrazellulären Matrix mit teilweise netzförmiger Anordnung der Fasern zu finden. Diese Auflockerung kann auch in weiterer Hinsicht auf den Einfluss des in dieser Phase vorherrschenden Hormons Östrogen zurückgeführt werden, welches nach DÖCKE (1994) sowie LINDZEY und KORACH (1999) eine Wassereinlagerung sowie Hyperämie im Zervixgewebe während des Östrus hervorruft. Eine vermehrte Vaskularisierung konnte auch in den eigenen Untersuchungen mittels Darstellung des Aktins in der Follikelphase (Östrogen-Dominanz) nachgewiesen werden. Die erhöhte Blutgefäßanzahl in dieser Zyklusphase korreliert mit einer stark ausgeprägten Expression des VEGF auf mRNA-Ebene. Diese Beobachtung stimmt mit Untersuchungen von CULLINAN-BOVE und KOOS (1993) am Uterus von Ratten überein, die ebenfalls eine Östrogen-bedingte Stimulation der VEGF-Expression, die schon wenige Stunden nach der Hormonapplikation auftrat, nachweisen konnten.

All diese Phänomene sind notwendig, um einerseits die Passage von Spermien um den Zeitpunkt der Ovulation durch Erweichung des Gewebes und Erweiterung des Zervikalkanals zu gewährleisten (MOGHISSI 1999) und andererseits um auf den durch die erhöhte Durchlässigkeit der Zervix verursachten Anstieg der Infektionsgefahr durch Bereitstellung von Abwehrzellen zu reagieren (KUTTEH et al. 1998).

In der Lutealphase verschwinden die Erscheinungen wie Sekretion und Einwanderung von Zellen in den untersuchten Präparaten vorerst wieder, was auf den steigenden Einfluss des Progesterons zurückgeführt werden kann (DÖCKE 1994; ROBERTSON et al. 1996; RAMOS et al. 2000). Die Zervix ist in der frühen Lutealphase geschlossen, der Zervikalschleim ist hochviskös und eine Passage von Spermien findet nicht mehr statt (MOGHISSI 1999). Die unter Gestageneinfluss durch die Hemmung der eosinophilen Invasion hervorgerufene geringere Abwehrleistung wird durch diese Geschlossenheit der Zervix kompensiert (DÖCKE 1994). In den vorliegenden Untersuchungen erscheint das Gewebe der Zervix des Weißbüschelaffen in der frühen Lutealphase (Tag 7 LP) vorerst wieder dichter und die Expression der MMPs ist geringer als in der Follikelphase. Dies kann nach FUNK und DEMAYO (1999) wiederum auf einer Hemmung der Aktivität von MMPs durch Progesteron beruhen, wie sie in Zellkulturen nachgewiesen wurde. Auch die Blutgefäßversorgung geht in den für die vorliegende Arbeit untersuchten Zervix-Präparaten während der frühen Lutealphase zurück und VEGF wird auf mRNA-Ebene nicht exprimiert. Nach FRASER und LUNN (2001) wird die Angiogenese im Ovar, speziell im C.I. des Primaten, die stark vom Vorhandensein des VEGF abhängt, z.B. durch Gonadotropine reguliert, dessen Konzentrationen in der späten Follikelphase ansteigen, kurz vor der Ovulation ihren Höhepunkt erreichen und danach wieder absinken (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 1991). Ein ähnlicher Einfluss durch Gonadotropine könnte auch für die Vaskularisierung der Zervix vorliegen. In der frühen Lutealphase steigen die Progesteronspiegel an bis zu einem Maximalwert ca. in der mittleren Lutealphase. Eventuell sind die angiogenetischen Stimuli durch Wegfall der LH-Induktion und der gerade erst im Aufbau befindlichen Progesteronwirkung zum Zeitpunkt der Organentnahme in der frühen Lutealphase vorübergehend zu gering, um einen Effekt auf die Gefäßbildung zu erzielen.

In der späten Lutealphase (Tag 13/14 LP) sind in den eigenen Untersuchungen die Kollagenfasern der Extrazellulären Matrix wieder aufgelockert, eine VEGF-Expression ist vorhanden und die Blutgefäßversorgung steigt an, was durch den sinkenden Progesteronspiegel zum Ende der Gelbkörperphase hervorgerufen werden könnte. Andererseits spielt Progesteron in bezug auf die Vaskularisierung z.B. im Uterus eine duale Rolle: es kann die VEGF-Expression fördern, vermutlich über Stimulation der PGE₂-Synthese, und es kann als potenter Inhibitor der Angiogenese fungieren, um die Vaskularisierung zu kontrollieren (FUNK u. DEMAYO 1999). Die Gegensätze in der Wirkung des Progesterons auf den VEGF sind möglicherweise abhängig von der Konzentration des Hormons und könnten demnach auch in den verschiedenen Zyklusstadien unterschiedlich sein.

In bezug auf die Synthese und Wirkung der Sexualsteroiden konnte in der vorliegenden Arbeit eine Expression der Östradiol- und Progesteronrezeptoren im Zervixgewebe auf Transkript- bzw. Proteinebene in Epithel- und Stromazellen sowohl in der Follikel- als auch in der Lutealphase nachgewiesen werden, was die Zervix als Zielorgan für die Wirkung dieser Hormone ausweist. Nach FUNK und DEMAYO (1999) stimulieren Östrogene die Expression beider Steroidhormonrezeptoren. Einerseits exprimieren im Allgemeinen die Zielzellen

ständig ER auf einem basalen Wert, um sofort geringste Mengen des Hormons zu registrieren und auf die Stimulation antworten zu können, was die relativ ausgeglichene Expression des ER in der vorliegenden Untersuchung in allen Zyklusphasen erklären könnte. Andererseits führen die Östrogene nachweislich im Uterus zu einer Induktion der PR-Expression, um das Gewebe auf die in der Lutealphase bevorstehende Progesteronwirkung vorzubereiten, weshalb eine deutliche Expression des PR, wie bei den vorliegenden Versuchen, auch in der Follikelphase vorhanden ist. Unter hohem Progesteron-Einfluss wird die PR-Expression dagegen gehemmt, was zu der in der hier vorgestellten Arbeit nachgewiesenen, geringeren Expression auf mRNA-Ebene in der Progesteron-dominierten frühen Lutealphase führen könnte. Die Tatsache, dass trotz der nur gering vorhandenen mRNA eine Expression auf Proteinebene dennoch vorhanden ist, lässt sich dadurch erklären, dass beide Vorgänge (Umschreiben der genetischen Information in mRNA und Übersetzen der Information in die Proteinstruktur) zwar eng zusammenhängen, zeitlich jedoch versetzt ablaufen. Es kann demnach nicht davon ausgegangen werden, dass die maximale mRNA-Produktion stets mit der maximalen Proteinsynthese zusammenfällt. Zusätzlich ist eine Rückkopplung zwischen Protein- und mRNA-Expression denkbar, wodurch letztere z.B. wieder runterreguliert werden kann, während erstere noch auf dem Höhepunkt ist. Das Ergebnis hängt also davon ab, welches Zeitfenster im Versuch aktuell dargestellt wird. Der Wiederanstieg der PR-Expression in der vorliegenden Untersuchung zum Ende der Lutealphase könnte wiederum auf den sinkenden Progesteronspiegel zurückgeführt werden. Eine Östrogensynthese konnte durch die Untersuchung auf das Vorhandensein der 17 β HSD7 im Gewebe der Zervix des Weißbüschelaffen nicht nachgewiesen werden. Die positive Reaktion weniger Blutgefäße könnte auf eine vasoaktive Wirkung des Östradiols hinweisen, was aber weiter abgeklärt werden müsste.

Eine Expression des LGR7 und des Relaxins selbst ist bei den hier untersuchten Weißbüschelaffen im gesamten Zyklus vorhanden, wobei in der frühen Lutealphase auf Transkript-Ebene jeweils kein Signal erscheint. Die Expression des Relaxinrezeptors LGR7 ist in der späten Follikelphase auch auf Proteinebene deutlicher ausgeprägt und zeigt in der späten Lutealphase sowohl auf Protein- als auch auf Transkript-Ebene die stärkste Ausprägung. Diese Beobachtungen sind ähnlich den von IVELL et al. (2003) für den Uterus von Primaten veröffentlichten Ergebnissen, wo die Expression wie hier in der Zervix v.a. in den Stromazellen auftritt und in der späten Follikelphase deutlich vorhanden ist sowie zum Ende der Lutealphase zunimmt. Wenn keine Gravidität vorhanden ist, geht die Expression nach Angaben dieser Arbeitsgruppe am Ende der Lutealphase wieder zurück. Auch BOND et al. (2004) konnten im Endometrium des Menschen eine gesteigerte LGR7-Expression während der Lutealphase nachweisen. Somit kann eine prinzipielle Übereinstimmung der in der Literatur für den Uterus und der in der vorliegenden Arbeit für die Zervix erarbeiteten Ergebnisse festgestellt werden. In den untersuchten Präparaten der Zervix des Weißbüschelaffen ist die LGR7-Expression in der frühen Lutealphase aber auf Transkript-Ebene nicht nachweisbar und in der Immunhistochemie tritt hier eine deutlich schwächere Expression auf als in der späten Follikel- und späten Lutealphase. Dieses LGR7-Expressionsmuster in der Zervix entspricht im Wesentlichen den von EINSPANIER et al. (1997) am Uterus des Weißbüschelaffen erhobenen Ergebnissen für den Nachweis des Relaxins mit einer schwachen Expression in der frühen Follikelphase (Tag 4 FP), einer starken Expression in der späten Follikel- sowie mittleren bis späten Lutealphase (Tag 7 FP).

bzw. Tag 9-12 LP). Am Tag 14 der Lutealphase war das Signal bei nichtgraviden Tieren schon wieder schwächer, ähnlich denen der frühen Follikelphase. Mittels Immunhistochemie konnte die gleiche Arbeitsgruppe eine vermehrte Expression des Relaxins in den Thekazellen des Follikels der späten Follikelphase und nach Bildung des Corpus luteum eine stetig steigende Expression in den Lutealzellen nachweisen. In der vorliegenden Arbeit erbrachte der Relaxinnachweis in der Zervix eine ähnlich schwache positive Reaktion in allen 3 Zyklusphasen auf Proteinebene. Auf mRNA-Ebene war wie beim Nachweis des LGR7 in der frühen Lutealphase kein Signal vorhanden, während die späte Lutealphase und v.a. die späte Follikelphase positiv reagierten. Aufgrund der erarbeiteten Ergebnisse ist eine geringe, zusätzlich zur Synthese im Uterus auftretende Synthese des Relaxins in der Zervix in der späten Follikel- bzw. späten Lutealphase denkbar, die bisher in der Literatur noch nicht erwähnt wurde. Es ist deutlich zu sehen, dass für Relaxin und LGR7 in der Zervix ähnliche Expressionsmuster in Epithel- und v.a. Stromazellen vorliegen. Beide Nachweise zeigten positive Ergebnisse in der späten Follikelphase, einen Rückgang der Expression in der frühen Lutealphase und ein Wiederauftreten bzw. eine stärkere Expression in der späten Lutealphase. Neben der prinzipiellen Korrelation zwischen dem Nachweis des Relaxins und des LGR7 in der Zervix des Weißbüschelaffen kann aber auch ein Zusammenhang der von EINSPANIER et al. (1997) charakterisierten Relaxinsynthese des Weißbüschelaffen (starke Expression in später Follikel- und später Lutealphase) mit der hier erfolgten Darstellung der Expression des LGR7 in der Zervix hergestellt werden. Somit könnte die Rezeptorexpression in der Zervix parallel zum lokal neben der Zervix v.a. im Uterus synthetisierten Relaxin reguliert werden, damit das Hormon in der Zervix eine optimale Wirkung entfalten kann.

5.2 Lokale Applikation von rekombinantem humanen (rh)Relaxin

5.2.1 Messung des Zervix-Innendurchmessers *in vivo*

Im Rahmen des *in vivo*-Versuchs wurde die Wirkung lokal an die Zervixportio applizierten Relaxins auf eine mögliche Erweiterung der Zervix untersucht. Dazu wurde der Innendurchmesser des Organs mittels speziell angefertigter Messröhrchen ohne und mit Relaxinapplikation mit 30-minütiger Einwirkzeit bestimmt. Dass Relaxin einen erweichenden und erweiternden Effekt auf die Zervix der Frau hat, wurde unter anderem von BRYANT-GREENWOOD und SCHWABE (1994) berichtet. Porzines bzw. rekombinantes humanes Relaxin wurden zum Ende der Gravidität intrazervikal appliziert und führten nach den Autoren zu einer erleichterten und schnelleren Geburt. In der vorliegenden Arbeit wurde humanes rekombinantes Relaxin verwendet, da Relaxin von nichtmenschlichen Primaten mit dem vom Menschen eine größere Sequenz-Homologie aufweist als im Vergleich zum Schwein (EINSPANIER et al. 1997).

Bei den für die vorliegende Arbeit untersuchten Weißbüschelaffen konnte festgestellt werden, dass die Relaxinapplikation grundsätzlich zu einer Erweiterung des Durchmessers führte. Aufgrund der Nutzung von Tieren mit unterschiedlicher Zuchterfahrung konnten weitere, interessante Daten aus diesem Versuch abgeleitet werden. Die Ausgangsweite der Zervix ohne jegliche Hormonbehandlung war bei den Tieren mit Zuchterfahrung (2-6 Geburten) im Durchschnitt größer als bei den Tieren ohne Zuchterfahrung (keine Geburten).

Auch die durchschnittlichen Messwerte nach 30-minütiger Einwirkung des lokal applizierten Relaxins ergaben bei vorhandener Zuchterfahrung höhere Werte als bei den Tieren ohne Zuchterfahrung. Die jeweils größeren Zervix-Innendurchmesser bei den Tieren mit Zuchterfahrung können auf die zurückliegenden Geburten bei diesen Tieren zurückgeführt werden, da sich der juvenile Zustand des Organs nach der ersten Geburt nicht wieder einstellt. Besonders interessant ist weiterhin die Betrachtung der Differenz zwischen Ausgangswert und Messwert nach Relaxingabe und damit die Erweiterung des Durchmessers an sich. Dabei kann man sehen, dass die durchschnittliche Erweiterung des Zervixdurchmessers bei den Tieren mit Zuchterfahrung mit einem Wert von $0,81 \pm 0,3$ mm deutlich, wenn auch nicht signifikant, geringer ist als die bei den Tieren ohne Zuchterfahrung ($1,0 \pm 0,5$ mm). Daraus kann man einerseits ableiten, dass die Organe der noch nie der hormonellen Situation und den Strapazen einer Geburt ausgesetzten Tiere ein größeres Erweiterungspotential zu besitzen scheinen, da sie noch keine Gewebeveränderungen, wie sie bei der Geburt vorkommen, erfahren haben. Andererseits unterliegt die Wirkung des Relaxins und somit die Erweiterung der Zervix wahrscheinlich gewissen Grenzen, so dass eine „unendliche“ Erweiterung des Gewebes nicht möglich ist. Diese Erkenntnis sollte nicht verwundern, denn der Reproduktionstrakt unterliegt offenbar in bezug auf die Geweberemodulierung einem effektiven Selbstschutzmechanismus. Einerseits ist in bezug auf die Wirkung des Relaxins in der Zervix eine Regulierung durch begrenzte Rezeptorexpression oder eine Beschränkung der Wirkung durch einen proteolytischen Abbau des Hormons selbst möglich. WINKLER und RATH (1999) sowie RATH et al. (1994) erwähnen andererseits für die Zervix im Zusammenhang mit der Geburt eine Limitierung der tiefgreifenden, gewebeverändernden Prozesse z.B. durch Ausschüttung von Kollagenaseinhibitoren (TIMPs) und ein Wiedereinsetzen der Synthese von Bindegewebskomponenten. Entgegen den Ergebnissen von Studien an humanen Hautfibroblasten-Zellkulturen, wo synthetisches, humanes Relaxin zu einer verringerten Expression von TIMPs führte (UNEMORI u. AMENTO 1990), konnten QIN et al. (1997b) am Gewebe fetaler Membranen beim Menschen nach der Einwirkung humanen Relaxins direkt auf die Gewebekultur keinen solchen Effekt feststellen. Im Gewebe von Uterus und Zervix des Schweins ist durch den Einfluss systemisch applizierten porzinen Relaxins allerdings eine gesteigerte Sekretion des TIMP-1 und -2 von LEHNHARDT et al. (2002) nachgewiesen worden, was *in vivo* eine selbstregulierende Aktivität des Relaxins durch Stimulation dieser Faktoren im Rahmen der Geweberemodulierung vermuten lässt.

5.2.2 Untersuchung von Organen nach lokaler Applikation von rhRelaxin

Um den erweiternden Effekt des Relaxins auch im Hinblick auf strukturelle Veränderungen im Gewebe weiter zu beleuchten, wurden Zervices von Weißbüschelaffen untersucht, denen ebenfalls lokal an die Zervixportio rhRelaxin appliziert wurde, das für $\frac{1}{2}$ h, 1 h oder 2 h einwirken konnte.

In der Histologie wurden in jeder untersuchten Gruppe eine deutliche Sekretion im Epithel sowie Eosinophile in der Lamina propria und Muskularis festgestellt. Diese Beobachtungen können, da sie in jedem der Präparate auftreten, eventuell auch auf den Zyklustand der Tiere in der Follikelphase (Östrogen-Einfluss) zurückgeführt werden, da sie in den für die vorliegende Arbeit untersuchten Präparaten intakter, zyklischer Tiere ebenfalls festgestellt

werden konnten. Unterschiede zwischen den verschiedenen Einwirkzeiten zeigen sich in der Ausprägung der Bindegewebeschicht, die mit steigender Relaxin-Einwirkzeit stärker aufgelockert und vaskularisiert erscheint. Diese Ergebnisse können auf den Einfluss des Relaxins zurückgeführt werden, da sie mit längerer Relaxineinwirkung stärker in Erscheinung treten. Nach PALEJWALA et al. (2001) stimuliert Relaxin in Zellkulturen von humanen unteren-Uterussegment-Fibroblasten die Synthese von geweberemodulierenden MMPs (MMP-1, -2, -3). LEHNHARDT et al. (2001) konnten durch Untersuchungen an Schweinen eine durch Relaxin hervorgerufene gesteigerte Synthese der MMP-2 und MMP-9 in der Zervix nachweisen. Die Stimulation von MMPs scheint ein wichtiger Mechanismus zur Vermittlung der auflockernden Wirkung des Relaxins im Bindegewebe zu sein und kann von lokal produziertem Relaxin hervorgerufen sowie durch ebenfalls lokal stimulierte TIMPs begrenzt werden (QIN et al. 1997 a+b). Mit Bezug auf diese Untersuchungen konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine gesteigerte Expression der MMPs in der Zervix festgestellt werden. Vergleicht man die MMPs untereinander, tritt allerdings eine tendenziell stärkere Expression der MMPs-1 und -2 im Gegensatz zur MMP-9 in Erscheinung. Eventuell kommen für einen strukturellen Umbau des Gewebes weitere destabilisierende Mechanismen zum Tragen: an Zellkulturen von humanen Hautfibroblasten konnten UNEMORI und AMENTO (1990) neben einer durch Relaxin hervorgerufenen Stimulation von MMPs ebenso eine potente, relaxininduzierte Hemmung der Kollagensynthese selbst induzieren. Dabei konnte Relaxin zusätzlich den stimulierenden Effekt von Faktoren wie Interleukinen (IL-1 β) und Wachstumsfaktoren (TGF β) auf die Kollagensynthese unterdrücken. Denkbar wäre zudem eine Synthese weniger vernetzter, dafür leichter löslicher Kollagene, wie sie zum Zeitpunkt der Geburt in der reifen Zervix nachgewiesen wurde (RATH et al. 1994).

In bezug auf die Gefäßausbildung kann in den vorliegenden Präparaten eine erhöhte Anzahl von Blutgefäßen in den Organen der Tiere mit einer Relaxineinwirkzeit von 1 und 2 h gesehen werden. Da nur ein Tier mit einer 2-stündigen Relaxineinwirkung zur Verfügung stand, sind für die Gefäßanzahl in diesem Präparat keine Vergleichswerte vorhanden. Individuell unterschiedliche Werte wie in der Gruppe mit 1 h Hormoneinwirkung, die beispielsweise auf die unterschiedliche Historie der Tiere (z.B. Geburtenzahl), individuell unterschiedliche endokrine Situationen oder Rezeptorausstattungen zurückzuführen wären, könnten auch hier möglich sein. Da die Werte nach 1 und 2 h Relaxineinwirkung aber insgesamt höher sind als die nach ½ h, wäre dennoch ein tendenziell positiver Effekt auf die Gefäßanzahl bei längerer Einwirkzeit möglich. Allerdings zeigen sich in allen Gruppen tierindividuelle Schwankungen, so dass diese Daten einer weiteren Abklärung bedürfen, da man davon ausgeht, dass eine Gefäßneubildung i.d.R. 1-2 Tage Zeit benötigt. Es wären weitergehende Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Organen und einer weiteren Steigerung der Dauer der Relaxineinwirkung von Bedeutung, um die Gefäßbildung v.a. über einen längeren Zeitraum zu beobachten und die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse genauer einordnen zu können. Eine Expression des VEGF auf Transkript-Ebene konnte nicht nachgewiesen werden. Das könnte einerseits durch die Aktivität eventuell vorhandenen VEGFs ohne erneute Synthese oder aber auf die Wirkung von anderen angiogenetischen Faktoren hinweisen. Als solche Faktoren sind z.B. Angiopoietin und Erythropoietin für Endometrium bzw. Plazenta von Primaten nachgewiesen worden (ROWE et al. 2003; ZHOU et al. 2003; MASUDA et al. 2000). Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch

in der Zervix uteri denkbar und könnte sich für eine lokale, Relaxin-induzierte angiogenetische Wirkung verantwortlich zeigen.

Die Expression der Steroidrezeptoren ER α und PR erscheint in den eigenen Untersuchungen sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene wie bei den zyklischen Tieren in allen Gruppen gleich ausgeprägt. Ein Effekt des lokal applizierten Relaxins in Abhängigkeit von der Einwirkdauer kann hier also nicht nachgewiesen werden. Auch die Expression der 17 β HSD7 ist in allen Präparaten gleich. Neben positiven Blutgefäßen treten im immunhistochemischen Nachweis allerdings auch stellenweise positive Zellen im Epithel in Erscheinung, ähnlich der von KRUSCHE et al. (2001) nachgewiesenen Expression im Endometrium von Ratten. Dies wirft die Frage nach einer Östrogensynthese in der Zervix auf, was weiter untersucht werden müsste.

Auch die Expression des Relaxins selbst wird durch die unterschiedliche Dauer der lokalen Relaxineinwirkung nicht beeinträchtigt. Auf Transkript-Ebene konnten keine Relaxin-mRNA-Signale nachgewiesen werden, was den Rückschluss auf eine zu diesem Zeitpunkt nicht vorhandene Transkription des Relaxingens bzw. Synthese des Relaxins zulässt. Der Nachweis des Relaxins auf Proteinebene konzentriert sich v.a. auf das Epithel und die Blutgefäße, ein Erscheinungsbild, welches mit der lokalen Applikation und der Aufnahme des Hormons über die luminale Oberfläche zusammenhängen könnte. Gleichzeitig wäre es denkbar, dass die nach lokaler Applikation von rhRelaxin an die Zervixportio hohen örtlichen Relaxin-Konzentrationen im Zervix-Gewebe die bei den zyklischen Tieren nachgewiesene mögliche Relaxinsynthese durch Rückkopplung hemmen. Die Transkription könnte dadurch abgeschaltet werden, weshalb bei den hier untersuchten Tieren keine Transkripte mehr nachgewiesen werden konnten. Die Expression des LGR7 verhält sich in den für die vorliegende Arbeit untersuchten Präparaten offenbar umgekehrt proportional zur Relaxineinwirkzeit: bei längerer Relaxineinwirkung geht die Rezeptorexpression tendenziell zurück. Nach 2 h Einwirkzeit ist so gut wie keine Expression in stromalen Zellen mehr vorhanden. Hier könnte für den LGR7 ein ähnliches Phänomen, wie einerseits beim Relaxin selbst und andererseits bei den zyklischen Tieren für den Progesteronrezeptor beschrieben, vorliegen, wonach ein Rückgang der Rezeptorexpression durch negative Rückkopplung unter dem Einfluss hoher Hormonspiegel stattfindet (FUNK u. DEMAYO 1999), die hier nach lokaler Applikation im Gewebe vorliegen. Dadurch könnte auch die fehlende Expression auf mRNA-Ebene erklärt werden, denn aufgrund der Daten der zyklischen Tiere kann von einer im physiologischen Zustand vorhandenen LGR7-Expression ausgegangen werden, die hier durch den Einfluss hoher lokaler Relaxin-Konzentrationen gehemmt werden könnte. Die positive Reaktion der Blutgefäße könnte auf einen direkten vasoaktiven Einfluss des Relaxins hinweisen, was zum Beispiel mit der höheren Blutgefäßanzahl nach längerer Relaxin-Einwirkung auf das Gewebe in positivem Zusammenhang stehen und weiterhin das Fehlen einer VEGF-Synthese erklären könnte.

Zusammenfassend kann insgesamt für die lokale Relaxinwirkung (5.2.1 u. 5.2.2) gesagt werden, dass an die Zervixportio appliziertes Relaxin nachweislich einen erweichenden und dadurch erweiternden Effekt auf das Gewebe des Gebärmutterhalses hat, der sowohl *in vivo* als auch durch Untersuchung von Organmaterial ermittelt werden konnte. Dieser Effekt ist verbunden mit einer strukturellen Änderung des Bindegewebes, einer geringgradigen Einwanderung von Granulozyten und einer verstärkten Expression kollagenolytischer

Enzyme (MMPs). Desweiteren konnten eine leichte Tendenz zur Stimulation der Gefäßversorgung sowie ein Rückgang der Relaxinrezeptorexpression bei längerer Relaxin-Einwirkung auf das Gewebe der Zervix nachgewiesen werden, der vermutlich durch hohe lokale Relaxin-Konzentrationen nach lokaler Applikation des Hormons hervorgerufen wird.

5.3 Untersuchungen von Organen systemisch hormonbehandelter Tiere

Aus den durch die Untersuchung normal-zyklischer und lokal mit Relaxin behandelter Tiere gewonnenen Erkenntnissen heraus sollten ebenfalls Organe systemisch hormonbehandelter Tiere betrachtet werden. Durch die bei den zyklischen Tieren beobachteten, durch Östrogeneinfluss hervorgerufenen deutlichen Veränderungen im Gewebe der Zervix sollten Effekte systemisch applizierten Östradiols zum Vergleich mit denen systemisch verabreichten Relaxins, sowie ein möglicher Kombinationseffekt beider Hormone untersucht werden. Um endogene Quellen für diese vornehmlich ovariell synthetisierten Hormone auszuschalten, sind ovariectomierte Tiere für diesen Versuch eingesetzt worden. Als Kontrollgruppe dienten ebenfalls ovariectomierte Tiere, die keine Hormonbehandlung erfahren haben. Da umfangreiche Untersuchungen am Gewebe vorgenommen werden sollten, musste ausreichend Material zu Verfügung stehen. Dafür war die Entnahme jeweils der gesamten Zervix der Tiere erforderlich. Aufgrund dessen konnte direkt für die in diesem Versuch verwendeten Tiere keine Erhebung von Daten vor, sondern nur nach der Hormonbehandlung durchgeführt werden. Zum Vergleich für die durch die Hormonbehandlung hervorgerufenen Effekte dient die nicht behandelte Kontrollgruppe. Um die Ergebnisse in physiologischer Hinsicht einordnen zu können, stehen die intakten (nicht ovariectomierten), zyklischen Tiere zur Verfügung.

5.3.1 Systemische Behandlung mit 17 β -Östradiol

Bei Betrachtung der histologischen Präparate der über 10 Tage mit 1x täglich 35 μ g 17 β -Östradiol behandelten Tiere sind im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine starke Sekretion des Epithels, eine netzförmige Auflockerung der Fasern der Extrazellulären Matrix sowie ein deutlich vermehrtes Auftreten von eosinophilen Granulozyten im Bindegewebe zu sehen. Diese Ergebnisse stimmen mit den bei den zyklischen Tieren in der Östrogen-dominierten späten Follikelphase gemachten Beobachtungen (siehe 5.1) überein. Sie sind vermutlich eindeutige Anzeichen der Östradioleinwirkung im Gewebe. Bei Ratten wurde in zervikalem Gewebe nach Ovariectomie und systemischer Hormonersatztherapie mit Östradiol ebenfalls eine massive eosinophile Invasion festgestellt, die den Befunden von normalen, nicht ovariectomierten Tieren kurz vor der Geburt entsprach (LUQUE et al. 1998), womit im vorliegenden Primatenmodell ähnliche Ergebnisse erzielt werden konnten. Zusätzlich berichtet der Autor über die Bestimmung der durchschnittlichen Zervix-Nassgewichte, welche deutlich über dem Wert der Kontrollgruppe lagen. WINN et al. (1994) konnten bei ovariectomierten Sauen nach Östradiolgabe ebenfalls stark erhöhte Nassgewichte feststellen. Einen ähnlichen Effekt erzielten HUANG et al. (1997) durch eine Östradiolapplikation bei präpubertären weiblichen Schweinen. Auf den ersten Blick könnte eine Erhöhung der Nassgewichte bei vorhandener Erweichung und potentieller Erweiterung

des Gewebes verwirren, da dafür v.a. Kollagene abgebaut werden. Jedoch zieht die Östrogenwirkung eine Wassereinlagerung im Gewebe nach sich (LINDZEY u. KORACH 1999; MOGHISSI 1999; DÖCKE 1994), die sich auf das Gewicht auswirken kann. Dieser Effekt könnte durch einen Anstieg des Anteils v.a. der Hyaluronsäure in der Extrazellulären Matrix hervorgerufen werden, der wie von RATH et al. (1994) beschrieben, auch zum Ende der Gravidität und unter der Geburt in der Zervix vorkommt, wenn die Progesteronspiegel im Blut sinken und die Östrogenkonzentrationen noch hoch sind. In Zellkulturen von humanen Fibroblasten der Zervix uteri konnte Östradiol die Synthese von Hyaluronsäure steigern, während sie durch Progesteron deutlich gehemmt wurde (TANAKA et al. 1997), was diese Vermutung bestätigt. Die hohe Wasserbindungskapazität dieser Substanz führt zu einer Hydratisierung des Gewebes. Von HALL et al. (1992) wurde durch Östradiolapplikation bei ovariectomierten Sauen eine Erhöhung des Wassergehaltes des gesamten Uterus nachgewiesen. Das zwischen den Fasern der Extrazellulärmatrix eingelagerte Wasser führt zum Auseinanderweichen der Fasern und somit zu einer Lockerung der ehemals festgefügteten Struktur. Dies entspricht der in der vorliegenden Untersuchung beobachteten netzförmigen Anordnung der Fasern des zervikalen Bindegewebes. Auch die in der späten Follikelphase (siehe 5.1) im Zusammenhang mit der Einwanderung eosinophiler Granulozyten beobachtete vermehrte Expression der MMP-1 und -2 konnte nach systemischer Östradiolapplikation ebenso nachgewiesen werden. Es ist eine deutliche vermehrte Expression v.a. in den Granulozyten aber auch in den glatten Muskelzellen im Vergleich mit der Kontrollgruppe erkennbar. Bei der Expression der MMP-9 ist kein Effekt gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen. Durch die Stimulation der MMP-1 und -2 ist also auch hier ein weiterer, mit einer Gewebeerweichung verbundener Faktor nachgewiesen worden, der zusätzlich zur Wassereinlagerung durch einen Abbau der Fasern in der Umgebung der Zellen zum löchrigen Aussehen des Gewebes führen kann (JUNQUEIRA et al. 1980).

Die bei DÖCKE (1994) ebenfalls erwähnte, Östrogen-bedingte Hyperämisierung kann in den vorliegenden Untersuchungen durch systemische Applikation des Östradiols bei ovariectomierten Weißbüschelaffen nicht nachvollzogen werden. Auf mRNA-Ebene ist zum Zeitpunkt der Untersuchung kein VEGF-Signal zu sehen. Auch die ausgezählten, Aktin-positiven Gefäße ergaben keinen Unterschied zur Kontrollgruppe. Dies könnte die Vermutung aufwerfen, dass in bezug auf eine östrogene Induktion der Angiogenese, vermittelt durch VEGF, wie es in der vorliegenden Arbeit in physiologischer Situation gezeigt werden konnte, zusätzlich andere Mechanismen bzw. Stimuli zur Unterstützung nötig sind. Dies sind insbesondere Wechselwirkungen mit weiteren, ovariell synthetisierten bzw. beeinflussten Hormonen oder Faktoren (z.B. Progesteron, Relaxin, angiogenetische Faktoren, Wachstumsfaktoren), die bei den ovariectomierten Tieren in diesem Versuch fehlen.

In bezug auf die Expression der Steroidrezeptoren ER α und PR konnte wie im Zyklus eine ähnlich starke Expression beider Rezeptoren im Epithel und Stroma nachgewiesen werden. Östradiol stimuliert die Expression sowohl der eigenen als auch der Progesteron-Rezeptoren (FUNK u. DEMAYO 1999; LINDZEY u. KORACH 1999). Nach Untersuchungen von PILLAI et al. (2002) konnte im Uterus von Ratten eine systemische Applikation von Östradiol die ER α -Expression ebenfalls nicht gegenüber der Kontrolle steigern.

Zudem konnte eine Östrogensynthese in der vorliegenden Arbeit anhand des Nachweises der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase nicht nachgewiesen werden.

Der Nachweis des Relaxinrezeptors LGR7 ergab im Vergleich zur Kontrolle auf Proteinebene eine leicht erhöhte Expression, während die Signale auf Transkript-Ebene relativ schwach und nicht in jedem Präparat vorhanden waren. In der Literatur sind verschiedene Hinweise zu finden, dass Östradiol die Sensitivität von zervikalen Zellen gegenüber Relaxin z.B. durch Erhöhung der Anzahl der Relaxinrezeptoren steigern kann (LINDZEY u. KORACH 1999; HUANG et al. 1993). Auch TAN et al. (1999) haben im Uterus von Ratten eine Steigerung der Relaxinrezeptor-Dichte durch 17 β -Östradiol hervorrufen können. Auf Proteinebene ist in der vorliegenden Untersuchung im Gegensatz zur mRNA-Ebene eine Stimulation der Relaxinrezeptor-Expression sichtbar, was eine Möglichkeit zur Sensibilisierung der Zellen gegenüber dem entsprechenden Hormon darstellen könnte. In bezug auf die Korrelation zwischen der Expression auf mRNA- und Proteinebene könnte, wie schon bei den zyklischen Tieren (siehe 5.1) erwähnt, die Möglichkeit bestehen, dass durch Rückkopplung aufgrund hoher Rezeptorprotein-Konzentrationen die Transkription des entsprechenden Gens schon wieder gehemmt wird, weil keine weitere Rezeptorinteraktion benötigt wird. Die Transkription der DNA in mRNA und die folgende Translation zum Protein sind zeitlich versetzte und dennoch eng gekoppelte Mechanismen. Durch die Analyse mittels PCR wird immer nur eine Momentaufnahme ermöglicht, die verschiedene Zusammenhänge beinhalten kann. Möglicherweise kommen für einen solchen Effekt auf die Rezeptorexpression aber auch posttranskriptionelle bzw. posttranslationelle Regulationsmechanismen in Frage (z.B. nur die „Zurverfügungstellung“ vorhandener Rezeptoren). Die Expression des Relaxins selbst ist in den untersuchten Präparaten im Vergleich mit der Kontrolle auf Proteinebene erhöht, zeigt auf Transkript-Ebene allerdings wie in der Kontrolle keine Expression. Somit kann vermutet werden, dass entweder keine Relaxinsynthese in der Zervix durch isoliert verabreichtes Östradiol im Gegensatz zu den physiologischen Gegebenheiten während des Zyklus (siehe 5.1) hervorgerufen werden kann, oder dass wie für den LGR7 beschrieben, der Nachweis zu einem Zeitpunkt durchgeführt wurde, zu dem die Transkription schon „abgeschaltet“ wurde. Zusammengefasst wurde eine prinzipiell den physiologischen Gegebenheiten entsprechende Situation durch die systemische Östradiolapplikation (isolierte Wirkung dieses einen Hormons aufgrund der Ovariectomie) beim Weißbüschelaffen nachgewiesen. Die entsprechenden Beobachtungen können auf den Einfluss dieses Hormons zurückgeführt werden. Geringfügige Abweichungen vom physiologischen, an den intakten, zyklischen Tieren erhobenen Status sind beim Nachweis des Relaxins sowie in bezug auf die Vaskularisierung (Gefäßanzahl) des Gewebes zu sehen. Hier kommen möglicherweise in physiologischen Situationen Interaktionen mit weiteren ovariell synthetisierten oder durch weitere ovarielle Hormone gesteuerten Substanzen in Frage (Redundanz der Hormone), die hier durch die Ovariectomie fehlen. Es wäre z.B. eine Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege möglich. Hier kommen einerseits die typischen kernständigen, andererseits die membranständigen Rezeptoren in Frage, die eventuell unterschiedliche Wirkungen hervorrufen können. Weiterhin erwähnen BEATO und KLUG (2000), dass auch Protein-Protein-Interaktionen von Steroidhormonen mit anderen Transkriptionsfaktoren möglich sind, die die Aktivität vieler Gene beeinflussen können, so dass in physiologischen Situation ein anderes Zusammenspiel solcher Faktoren möglich wäre als im vorliegenden

Versuch. Abschließend kann gesagt werden, dass durch beide Untersuchungen – die der zyklischen und die der systemisch hormonbehandelten Tiere – ein guter Überblick über die durch das Östradiol hervorgerufenen, geweberemodulierenden Wirkungen in der Zervix geschaffen werden konnte.

5.3.2 Systemische Behandlung mit rhRelaxin

In der histologischen Untersuchung der Präparate der über 3 Tage systemisch mit 2x täglich 100 µg rhRelaxin behandelten Tiere konnten im Zervixgewebe eine kaum ausgeprägte Sekretion des Zytoplasmas der Epithelzellen, eine schwache Auflockerung der Bindegewebschicht sowie nur vereinzelt auftretende Eosinophile festgestellt werden. Diese Erscheinungen sind zwar in der Kontrollgruppe nicht zu sehen und dürften auf den Einfluss des Relaxins zurückzuführen sein, andererseits sind sie im Prinzip minimal und bei weitem nicht so ausgeprägt, wie nach systemischer Behandlung mit E2. Bei LUQUE et al. (1998) ist zu lesen, dass bei ovariectomierten und systemisch mit Relaxin behandelten Ratten im Gegensatz zur Behandlung mit Östradiol keine Invasion von Eosinophilen im Gewebe der Zervix induziert werden konnte. In bezug auf die lokal mit Relaxin behandelten Tiere (siehe 5.2.2) ist ein Effekt auf die Einwanderung von Zellen nach systemischer Gabe also eher unwahrscheinlich. Hinsichtlich der Sekretion ist ein Effekt erst nach längerer Behandlung (3 Tage versus wenige Stunden) bzw. nach systemischer statt lokaler Applikation zu sehen. Eine Auflockerung des Gewebes scheint dagegen schneller und potenter durch lokale Einwirkung des Hormons hervorgerufen werden zu können. Dies ist neben der Untersuchung der Organe lokal behandelter Tiere ebenfalls durch die Erweiterung des Zervix-Innendurchmessers im *in vivo*-Versuch (siehe 5.2.1) zu sehen. Neben den Hinweisen von BRYANT-GREENWOOD und SCHWABE (1994) zur Anwendung lokaler Relaxinapplikation zur Erleichterung der Geburt bei der Frau sind in der Literatur einige Hinweise zu einer lokalen bzw. auto-/parakrinen Wirkung des Relaxins zu finden (ANTHONY 1999; EINSPIANIER et al. 1997; QIN et al. 1997 a+b). Als Ursache für unterschiedliche Wirkungen nach systemischer, längerer und lokaler, kürzerer Relaxineinwirkung wäre die Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege möglich. Für die intrazelluläre Signalübertragung kommen beim Relaxinrezeptor zwei bisher bekannte Wege in Frage (siehe Abb. 5.1): 1) die schnellere Tyrosinkinase-Kaskade und 2) die Adenylatzyklase-Kaskade.

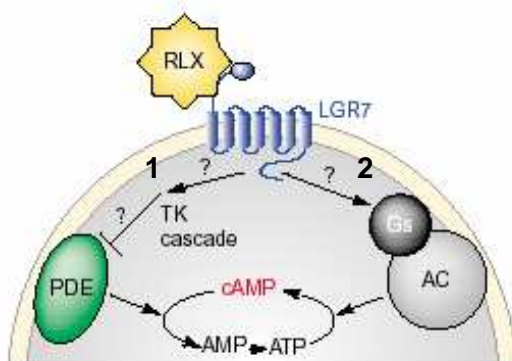


Abb. 5.1: Modell für die intrazelluläre Signaltransduktion nach Bindung des Relaxins (RLX) an den membranständigen Rezeptor (LGR7). Darstellung von 2 möglichen Wegen zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration: 1) Aktivierung einer Tyrosinkinase(TK)-Kaskade, dadurch Hemmung der Phosphodiesterase (PDE) und Anstieg der cAMP-Konzentration; 2) Aktivierung der Adenylatzyklase (AC) über ein stimulierendes G-Protein (Gs) (IVELL u. EINSPIANIER 2002)

Durch die Tyrosinkinase (TK) wird eine Hemmung der Phosphodiesterase (PDE) hervorgerufen, wodurch die intrazelluläre cAMP-Konzentration ansteigen kann (BARTSCH et al. 2001). Bei der Adenylatzyklase-Kaskade wird die Adenylatzyklase (AC) durch ein stimulierendes G-Protein (Gs) aktiviert und sorgt ebenfalls für einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Das cAMP fungiert als „second messenger“ und ruft durch eine nachfolgende Enzymkaskade die entsprechenden Wirkungen in der Zielzelle hervor (IVELL u. EINSPIANIER 2002). IVELL und EINSPIANIER (2002) sowie BARTSCH (2001) nehmen an, dass die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) eine Rolle in dieser Enzymkaskade spielt. Durch Aktivierung verschiedener Signaltransduktions-Kaskaden mit unterschiedlich schneller Transduktionsgeschwindigkeit könnten auch unterschiedlich schnell die Wirkungen in der Zelle in Erscheinung treten, was in den vorliegenden Versuchen nach lokaler bzw. systemischer Applikation denkbar wäre. Nach NISTRI und BANI (2003) ist vermutlich eine Aktivierung der Stickstoffmonoxyd(NO)-Synthase (NOS) und damit eine Erhöhung der NO-Konzentration in der Zelle einerseits durch den Adenylatzyklase-Weg (NOSII), andererseits durch den Tyrosinkinase-Weg (NOSIII) von Bedeutung, die sich wiederum auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration auswirkt. Eine Erhöhung der NO-Konzentration bedeutet einen hypoxischen Zustand der Zelle. Ein solcher Zustand wäre auch während der Geburt durch die starke Belastung des zervikalen Gewebes bei Austritt der Frucht (Druck, Dehnung) in den Zellen der Zervix denkbar und könnte zu einer Aktivierung der entsprechenden Enzym-Kaskaden führen.

Weiterhin wäre durch diese Ergebnisse und Überlegungen eine Erklärung möglich für das Phänomen einerseits der beim Menschen zur Geburt hin absinkenden peripheren Relaxin-Konzentrationen, wodurch man eine Bedeutung des Relaxins zu diesem Zeitpunkt lange ausschloss (PETERSEN et al. 1995; BRENNAND et al. 1997) und andererseits einem Ausreichen von lokal produziertem Relaxin und niedrigen Konzentrationen für das Hervorrufen einer Wirkung (BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994). Eine niedrige Relaxin-Konzentration zum Zeitpunkt der Geburt (BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994; PETERSEN et al. 1995; JAFFE 1999) wäre auch verständlich in Hinsicht der hemmenden Wirkung dieses Hormons auf die myometriale Aktivität. Diese wäre zum Zeitpunkt der Geburt ein hinderlicher Einfluss, der durch niedrige lokale Konzentrationen in „bedürftigem“ Gewebe wie z.B. der Zervix umgangen werden könnte.

Die Zervix-Nassgewichte der mit Relaxin behandelten Tiere waren gegenüber der Kontrollgruppe ebenso wie nach systemischer Östradiol-Behandlung erhöht. Bei ovariectomierten Sauen konnte ebenfalls eine Erhöhung der Zervix-Nassgewichte nach Relaxinapplikation festgestellt werden (WINN et al. 1994). Bei der Behandlung von präpubertären weiblichen Schweinen mit Relaxin konnten HUANG et al. (1997) allerdings keinen Einfluss auf die Nassgewichte der Zervix erkennen, womit diesbezüglich also keine einheitliche Aussage über die Wirkung des Relaxins vorliegt. Da ein Auseinanderweichen der Fasern in den vorliegenden Untersuchungen nicht wie nach der Östradiolapplikation (siehe 5.3.1) zu sehen ist, scheint ein Effekt auf die Wassereinlagerung hier nicht zu dominieren, sondern eventuell eine Bevorzugung anderer Mechanismen wie Kollagenolyse und Sekretion weniger vernetzter, löslicherer Fasern von Bedeutung zu sein. Relaxin ruft auch tatsächlich im vorliegenden Versuch eine Stimulation der kollagenolytischen Enzyme MMP-1 und -2 im Zervixgewebe des Weißbüschelaffen hervor, auch wenn diese in der vorliegenden Untersuchung geringer ausgeprägt ist als nach Östradiol-Behandlung. Ein solcher positiver

Effekt entspricht den von PALEJWALA et al. (2001) gemachten Beobachtungen an Zellkulturen von humanen Fibroblasten aus dem unteren Uterussegment. Die Aktivität bzw. Synthese der MMP-9 war in den vorliegenden Untersuchungen nicht von einer Steigerung betroffen, wobei dies der Beobachtung eines Anstieges der Synthese nicht nur der MMP-2 sondern auch der MMP-9 durch Relaxin in der Zervix von Schweinen durch LENHARDT et al. (2001) widerspricht. Die Lokalisation der in den für die vorliegende Arbeit untersuchten Präparaten nachgewiesenen MMPs entspricht dem bereits beschriebenen Auftreten v.a. MMP-1- und MMP-2-positiver Granulozyten und dürfte deswegen mit der geringgradigen Einwanderung solcher Zellen im Zervixgewebe zusammenhängen.

Eine durch Relaxin hervorgerufene Stimulation des VEGF und eine damit verbundene erhöhte Vaskularisierung des Gewebes, wie sie am Uterus bzw. entsprechenden Zellkulturen nachgewiesen wurden (PALEJWALA et al. 2002; ANTHONY 1999), konnten in der vorliegenden Arbeit für die Zervix des Weißbüschelaffen nicht beobachtet werden. Ein negatives Signal auf Transkript-Ebene entspricht den Ergebnissen für die lokal mit Relaxin behandelten Tiere (siehe 5.2.2). Bei diesen Tieren konnte allerdings bei steigender Einwirkzeit (1-2 h) auch eine erhöhte Gefäßanzahl im Gewebe festgestellt werden, die vielleicht auf andere angiogenetische Faktoren wie Angiopoietin bzw. Erythropoietin zurückzuführen ist. So scheint in bezug auf diesen Parameter wie für die Auflockerung der Extrazellulären Matrix eine lokale Behandlung zu einer stärkeren bzw. schnelleren Wirkung führen zu können.

Der Nachweis der Steroidrezeptoren entspricht dem der Kontrollgruppe, womit wie bei der lokalen Applikation (siehe 5.2.2) kein Effekt des systemisch verabreichten Relaxins gesehen werden kann. Dies entspricht einer Untersuchung von PILLAI et al. (2002), bei der keine Effekte systemisch applizierten Relaxins auf die ER α -Expression im Uterus von Ratten nachgewiesen werden konnte. Auch der Nachweis der 17 β HSD und damit einer möglichen Östrogensynthese in den Zellen des zervikalen Gewebes ist in der vorliegenden Untersuchung nicht positiv.

Systemisch appliziertes Relaxin scheint in der hier verwendeten Dosierung die Expression des eigenen Rezeptors positiv zu beeinflussen. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene sind positive Nachweise vorhanden. Der immunhistochemisch durchgeführte Proteinnachweis zeigt zusätzlich eine stärkere Ausprägung der LGR7-Expression als bei der Östradiol-Behandlung. Dies widerspricht auf den ersten Blick dem bei den lokal mit Relaxin behandelten Tieren beobachteten Rückgang der Rezeptorexpression mit steigender Einwirkzeit. Der Nachweis des Relaxins selbst zeigt auf Proteinebene zwar ein positives Signal, das sich in der Ausprägung jedoch nicht von dem durch die Östradiol-Behandlung hervorgerufenen unterscheidet. Allerdings ist hier zusätzlich ein positives Transkriptions-signal vorhanden, was auf eine stimulierte Relaxinsynthese in der Zervix aufgrund der systemischen Relaxinapplikation hinweisen könnte. EINSPANIER et al. (1997) vermuten für Primaten, dass die ohnehin im Vergleich mit Ratte und Schwein niedrigeren Serum-Relaxinkonzentrationen eventuell für physiologische Wirkungen nicht relevant sind, sondern vielmehr die lokale Biosynthese und Aktivität positiv beeinflussen. Dies könnte im vorliegenden Versuch sowohl durch die erhöhte Rezeptorexpression und einer damit verbundenen Sensibilisierung der Zellen gegenüber Relaxin, als auch durch die Stimulation der lokalen Relaxinsynthese im Gewebe der Zervix des Weißbüschelaffen belegt werden.

Zusammenfassend kann für systemisch verabreichtes Relaxin gesagt werden, dass es vermag, eine stärkere Aktivität des Epithels in Form von Sekretion und eine, wenn auch gering ausgeprägte, Auflockerung des zervikalen Bindegewebes durch Aktivierung von MMPs (MMP-1 und -2), z.B. infolge einer geringgradigen Rekrutierung von MMP-freisetzenden Zellen wie Granulozyten, hervorzurufen. Weiterhin wirkt es sich positiv auf die Expression der eigenen Rezeptoren (LGR7) und vermutlich auch auf die Relaxinsynthese in der Zervix aus. Eine vasoaktive Wirkung konnte nicht nachgewiesen werden. Hier ist, wie für die Auflockerung des Bindegewebes, eine stärkere Rolle lokal einwirkenden Relaxins (1-2 h) zu vermuten, was möglicherweise auf die Aktivierung anderer Signaltransduktionswege zurückgeführt werden kann. In bezug auf die LGR7-Rezeptorexpression scheint sogar ein gegenteiliger Effekt des systemisch bzw. lokal applizierten Relaxins vorzuliegen.

5.3.3 Systemische Behandlung mit Östradiol und Relaxin in Kombination

Die Tiere dieser Gruppe wurden systemisch über 10 Tage mit 35 µg 17β-Östradiol 1x täglich und zusätzlich an den letzten 3 Tagen mit 2x täglich 100 µg rhRelaxin behandelt.

Die Zervix-Nassgewichte sind in dieser Gruppe wie in den anderen systemisch hormonbehandelten Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, was auch von WINN et al. (1994) bei ovariectomierten und mit Östradiol und Relaxin behandelten Sauen gezeigt werden konnte. Auch HUANG et al. (1997) konnten die stärkste Erhöhung der Nassgewichte bei präpubertären weiblichen Schweinen durch Applikation von Östradiol und Relaxin in Kombination hervorrufen, wobei dieser Anstieg sogar signifikant höher war als der allein durch Östradiol erzielte. In bezug auf die Morphologie des Gewebes konnten in der vorliegenden Arbeit eine starke Sekretion des hochprismatischen Epithels, ein signifikanter Anstieg der Zellinvasion sowie eine deutliche Auflockerung der Fasern der Extrazellulären Matrix verbunden mit einem netzartigen Aussehen des Gewebes festgestellt werden. Mit der Auflockerung des Gewebes korreliert eine deutlich gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte Expression der MMP-1 und MMP-2, die wiederum v.a. in den Granulozyten zu finden sind. Bei Untersuchungen von Zervixgewebe der Ratte konnte ebenfalls durch systemische Applikation von Östradiol und Relaxin in Kombination eine eosinophile Invasion erzielt werden (LUQUE et al. 1998). Die Synthese kollagenolytischer Enzyme wird durch einen faserfreien Hof in der Umgebung der Zellen charakterisiert, der das auch in der vorliegenden Untersuchung beobachtete netzartige bzw. „löchrige“ Aussehen des Gewebes mit bedingt (JUNQUEIRA et al. 1980). Bei der Untersuchung von kultivierten zervikalen Zellen des Meerschweinchens wurde durch Untersuchung von präpubertären, unreifen Zellen festgestellt, dass eine Stimulation der MMP-1 nur durch Vorbehandlung mit Östradiol erreicht werden konnte (MUSHAYANDEBVU u. RAJABI 1995). Diese Effekte sind aufgrund der bisher in dieser Arbeit erarbeiteten Ergebnisse von den zyklischen und systemisch E2-behandelten Tieren (siehe 5.1 bzw. 5.3.1) v.a. auf den Einfluss des Östradiols zurückzuführen und erfahren in bezug auf die Einwanderung der Zellen sogar noch eine Steigerung. Eine verstärkte Vaskularisierung des Gewebes ist sowohl durch die erhöhte Anzahl der ausgezählten Gefäße als auch durch eine VEGF Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich mit der Kontrollgruppe und den Gruppen „E2“ sowie „RLX“ zu sehen. Sie stellt eine deutliche Kombinationswirkung der beiden Hormone dar, da sie in dieser Art weder nach der Relaxin- noch nach der Östradiolapplikation vorlag. Die Steroidrezeptor-

Expression (ER α , PR) wird wie zuvor in den anderen Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe auch nach kombinierter Behandlung nicht beeinflusst. Anders sieht es dagegen bei der Expression des Relaxinrezeptors LGR7 aus, der hier im Vergleich mit den anderen systemisch behandelten Gruppen auf Proteinebene eine maximale Stimulation erfährt und auch auf Transkript-Ebene ein positives Signal zeigt. Hier könnte ein stimulierender Effekt auf die Wirkung des Relaxins durch die Vorbehandlung mit Östradiol vorliegen, wie ihn schon BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE (1994) bei Untersuchungen durch den Maus-Bioassay an mit Östrogen vorstimulierten Tieren feststellen konnten, bei denen nach Applikation von Relaxin eine Verlängerung des kollagenreichen Schambeinsymphysen-Bandes zu sehen war. Die Expression des Relaxins selbst zeigt in der vorliegenden Untersuchung ein ähnliches Bild wie nach Relaxin-Behandlung: auf Transkript-Ebene ein positives und auf Proteinebene ebenfalls ein positives und somit der Östrogenbehandlung ähnliches Signal.

Zusammenfassend kann also in bezug auf die Sekretion des Epithels, die Auflockerung der Fasern des Bindegewebes, Einwanderung von eosinophilen Granulozyten sowie die Expression der MMP-1 und MMP-2 nach der Kombinationsbehandlung mit Östradiol und Relaxin ein dem Bild der Östrogenwirkung entsprechendes, maximales Ergebnis erzielt werden, wobei die Invasion der Eosinophilen unter der Gabe beider Hormone noch verstärkt ist. Hinsichtlich der LGR7- und Relaxinexpression im Gewebe sind nach Kombinationsbehandlung dagegen der Relaxinwirkung entsprechende Ergebnisse vorhanden, wobei die Expression des LGR7 noch stärker auftritt als nach alleiniger Behandlung mit Relaxin. Hier kommt wahrscheinlich die Fähigkeit des Östradiols, die Relaxinrezeptor-Dichte zu erhöhen, zum Tragen, wie sie für den Uterus der Ratte beschrieben (TAN et al. 1999) und ebenfalls in der vorliegenden Arbeit durch alleinige Östradiolapplikation gezeigt wurde (siehe 5.3.1). Die Vaskularisierung des zervikalen Gewebes sowie die VEGF-Expression zeigen nach Behandlung mit Östradiol und Relaxin ein maximales positives Ergebnis, das bei alleiniger Behandlung mit jeweils einem der beiden Hormone nicht erzielt werden konnte. Für die Steroidrezeptoren und die 17 β HSD7 sind wiederum keine von der Kontrollgruppe abweichenden Signale zu finden.

Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass sich die Wirkungen dieser beiden Hormone auf die Zervix hinsichtlich einer Erweichung des Gewebes ergänzen und teilweise sogar potenzieren können. HUANG et al. (1997) schließen aus ihren Untersuchungen am Uterus und an der Zervix von präpubertären weiblichen Schweinen ebenfalls, dass Östrogen und Relaxin synergistisch auf das Wachstum und die Entwicklung der Zervix wirken können. PILLAI et al. (1999) haben durch Versuche am Uterusgewebe von Ratten die Wahrscheinlichkeit einer Östrogenrezeptor-Stimulation durch Relaxin zur Erzielung einer östrogenähnlichen Wirkung im Gewebe aufgezeigt. Außerdem konnten SIEBEL et al. (2003) an graviden Mäusen feststellen, dass Relaxin die myometriale ER α -Expression stimuliert, was wiederum eine Interaktion beider Hormone vermuten ließe. Weiterhin wäre auch eine Aktivierung unterschiedlicher intrazellulärer Signaltransduktions-Kaskaden sowohl durch Relaxin (Tyrosinkinase, Adenylatzyklase) als auch durch Östradiol (über kernständige oder membranständige Rezeptoren sowie Protein-Interaktionen) möglich, die je nach Konzentration und Kombination auch unterschiedliche gemeinsame Wirkungen hervorrufen könnten.

5.4 Schlussbetrachtung

An dieser Stelle sollen abschließend noch einmal alle in der vorliegenden Arbeit gewonnen Erkenntnisse in bezug auf die Wirkung lokal und systemisch applizierten Relaxins sowie des Östradiols und einer Kombination aus beiden Hormonen auf das Gewebe der Zervix des Weißbüschelaffen zusammengefasst werden. Grundsätzlich lässt sich in bezug auf die Wahl des Tiermodells Weißbüschelaffe sagen, dass es aufgrund der zyklusabhängigen, physiologischen Gegebenheiten in der Zervix und deren Übereinstimmung mit den gesammelten Daten aus der Literatur als reproduktionsbiologisches Modelltier für den Menschen durch diese Versuche weitere Bestätigung findet. Neben der Bestätigung von für die Zervix bekannten Daten in bezug auf die Morphologie, Rezeptorexpression, Gefäßbildung und Aktivität kollagenolytischer Enzyme in den verschiedenen Zyklusphasen konnte erstmal auch eine zyklusabhängige sowie möglicherweise durch systemisch appliziertes Relaxin stimulierbare, lokale Relaxinsynthese für die Zervix des Weißbüschelaffen nachgewiesen werden, die in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurde.

Für die beiden an diesem Tiermodell untersuchten Hormone Östradiol und Relaxin konnten vielfältige Wirkungen auf das zervikale Gewebe des *Callithrix jacchus* nachgewiesen werden. So wirkt sich die Behandlung mit Östradiol stimulierend auf die sekretorische Aktivität des Epithels aus, bewirkt eine Einwanderung von Granulozyten, verbunden mit einer erhöhten Expression an der Geweberemodulierung beteiligter Matrix-Metalloproteinasen (MMP-1, MMP-2) und führt zu einer sichtbaren Auflockerung des Gewebes, die vermutlich mit einer gesteigerten Wassereinlagerung im Gewebe zusammenhängt. Die Expression des Relaxinrezeptors LGR7 konnte durch Östradiol stimuliert werden, was für eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber dem Hormon Relaxin durch Einwirkung des Östradiols spricht. Die im physiologischen Zustand erkennbare positive Beeinflussung der VEGF-Expression und eine damit verbundene, gesteigerte Vaskularisierung des zervikalen Gewebes konnten durch alleinige Applikation von Östradiol nicht erzielt werden. Möglicherweise sind im anatomisch und physiologisch intakten Individuum auch Wechselwirkungen mit weiteren ovariell synthetisierten Hormonen oder Faktoren für das Hervorrufen einer Wirkung notwendig. Hieraus ergibt sich ein Ansatzpunkt für weitergehende Untersuchungen einerseits in Hinsicht auf angiogenetisch wirkende Faktoren, andererseits in bezug auf die Expressionsmuster der MMPs.

Für die Wirkung des Relaxins können nur geringgradige Einflüsse auf die Sekretion und die Einwanderung von Zellen nachgewiesen werden. Allerdings ist letztere wiederum verbunden mit einer Stimulation der MMP-1 und MMP-2, die jedoch deutlich geringer ausfällt als nach Östradiolbehandlung. Eine Auflockerung des Gewebes ist nicht in gleicher Art sichtbar, wie durch das Östradiol hervorgerufen und muss wahrscheinlich auf andere Mechanismen zurückgeführt werden, da eine Wassereinlagerung und ein Auseinanderweichen der Fasern nicht in dieser Art auftreten. Vermutlich ist hier neben dem Kollagenabbau v.a. eine Hemmung der Kollagensynthese an sich sowie eine Synthese weniger vernetzter, dadurch leichter löslicher und somit weniger stabiler Kollagenfasern von Bedeutung (RATH et al. 1994; UNEMORI u. AMENTO 1990). Interessanterweise ist in der vorliegenden Arbeit ein deutlicher Unterschied zwischen systemischer und lokaler Relaxinapplikation zu verzeichnen, wobei die Auflockerung des Gewebes nach lokaler Applikation stärker in Erscheinung tritt. Somit scheinen lokale, direkte Effekte für die durch Relaxin hervorgerufene

Geweberemodulierung von größerer Bedeutung bei den Primaten (einschließlich Mensch) zu sein. Diese Feststellung kann durch die beim Primaten relativ niedrigen, peripheren Relaxin-Konzentrationen bestätigt werden. Ähnlich verhält es sich in bezug auf die Angiogenese, für die eine tendenzielle Stimulation durch lokale Applikation des Relaxins gezeigt werden konnte. Da auch hier kein positives VEGF-Signal vorhanden ist, ist zu vermuten, dass weitere Faktoren an einer Vermittlung der angiogenetischen Wirkung, wie z.B. Angiopoietin bzw. Erythropoietin beteiligt sind (ROWE et al. 2003; ZHOU et al. 2003; MASUDA et al. 2000). Auch in bezug auf die Expression des eigenen Rezeptors (LGR7) sind in den vorliegenden Untersuchungen unterschiedliche Effekte nach lokaler und systemischer Applikation zu verzeichnen: eine systemische Verabreichung von Relaxin scheint die Expression positiv zu beeinflussen, während sie mit steigender lokaler Einwirkzeit zurückgeht. Dies würde mit der Vermutung von EINSPIANIER et al. (1997) übereinstimmen, dass die periphere Relaxinzirkulation für lokale Wirkungen im Gewebe des Reproduktionstraktes nicht direkt verantwortlich ist, sondern eine lokale Aktivität und Wirkung vermittelt. Als ein solcher positiver Effekt wären die Bereitstellung von Rezeptormolekülen und weiterhin die ebenfalls nachgewiesene Stimulation einer lokalen Relaxinsynthese im Gewebe der Zervix denkbar. Für das lokal applizierte Relaxin könnte in bezug auf die Rezeptorexpression ein Effekt der negativen Rückkopplung bei hohen, lokal im Gewebe vorliegenden Hormonspiegeln zum Tragen kommen, wie ihn FUNK u. DEMAYO (1999) für den Progesteronrezeptor beschrieben haben. Insgesamt wären dann also für die Auflockerung und Erweichung des Gewebes, die auch im *in vivo*-Versuch durch Erweiterung des Zervix-Innendurchmessers nachgewiesen worden ist, sowie für die Vaskularisierung lokale Hormonkonzentrationen für eine Auswirkung auf das Gewebe der Zervix von größerer Bedeutung. Als Ursache für die Unterschiede zwischen den durch lokale und systemische Relaxinapplikation hervorgerufenen Effekten wäre eine Aktivierung jeweils unterschiedlicher intrazellulärer Signaltransduktions-Kaskaden denkbar.

Bei einer Kombination der beiden untersuchten Hormone Östradiol und Relaxin lassen sich in bezug auf die sekretorische Aktivität des Oberflächenepithels, die Einwanderung von Granulozyten, Stimulation der MMPs, sichtbare Auflockerung des Gewebes, Expression des Relaxinrezeptors LGR7 und des Relaxins selbst sowie auf die Vaskularisierung und VEGF-Expression durchweg positive und teilweise maximale Ergebnisse erzielen. Dies legt nahe, dass sich Östradiol und Relaxin in ihren Wirkungen einerseits ergänzen und andererseits die Feststellung von HUANG et al. (1997) bestätigt werden kann, dass Östradiol und Relaxin synergistisch auf die Zervix wirken können. Solch ein Zusammenspiel dieser beiden Hormone, wie es auch in physiologischen Situationen auftritt, z.B. während des Östrus zum Zeitpunkt des Eisprungs, wenn unter Östrogendominanz in der späten Follikelphase eine lokale Einwirkung des Relaxins den Eisprung unterstützt oder in bezug auf die Geburt, wenn bei Abfall des Progesteronspiegels die peripheren Östradiolkonzentrationen ansteigen und wiederum lokal vor Ort im Reproduktionstrakt das Hormon Relaxin seine Wirkung auf das Gewebe entfaltet (z.B. zur Ruptur der fetalen Membranen bzw. einer Erweichung des Geburtstraktes) macht durchaus Sinn und sollte auch bei therapeutischer Anwendung des Relaxins in der Reproduktionsmedizin z.B. zur Erleichterung der Geburt beachtet werden.

6 Zusammenfassung

Christina Simon

Die hormonelle Induktion der zervikalen Erweichung beim Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*).

Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht: Dezember 2004

(118 S., 38 Abb., 16 Tab., 133 Lit., 3 S. Anhang mit 1 Tab.)

Schlüsselworte: Zervix, Relaxin, Östradiol, Weißbüschelaffe

Dem Gebäutterhals (Zervix) kommt als kaudalem bzw. unteren Anteil des Uterus während der Gravidität und Geburt eine besondere Rolle im Reproduktionstrakt zu. Einerseits fungiert die Zervix als uteriner Verschlussapparat, der den Schutz des Embryos bzw. Fetus und dessen Verbleiben im Uterus während der gesamten Gravidität gewährleistet. Andererseits muss die Zervix zum Zeitpunkt der Geburt in kürzester Zeit erweichen und sich auf ein Vielfaches ihres Durchmessers erweitern können, um die Austreibung der Frucht zu ermöglichen (LEPPERT 1995; RATH et al. 1994; DANFORTH 1983).

Um diesen gegensätzlichen Aufgaben gerecht zu werden, bedarf es extremer geweberemodulierender Vorgänge in diesem Organ, die unter endokriner Kontrolle von Hormonen wie z.B. Östrogenen, Progesteron, Prostaglandinen, Oxytozin und Relaxin stehen (LINDZEY u. KORACH 1999; BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994).

Anhand des in der reproduktionsbiologischen Forschung etablierten Primatenmodells Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*) sollte mit der vorliegenden Arbeit ein Überblick über hormonelle, durch Relaxin und Östradiol induzierte Veränderungen in der Struktur der Extrazellulären Matrix des Bindegewebes, der Expression kollagenolytischer Enzyme (Matrix-Metalloproteinasen, MMPs), der Rezeptorexpression sowie der Blutgefäßversorgung in der Zervix mittels histologischer, immunhistochemischer und molekularbiologischer Methoden erarbeitet werden. Dazu soll einerseits die Wirkung lokal und systemisch applizierten Relaxins und andererseits die Wirkung systemisch applizierten Relaxins mit der ebenfalls systemisch verabreichten Östradiols verglichen sowie ein möglicher Kombinationseffekt beider Hormone auf das Gewebe der Zervix untersucht werden.

Um direkt einen erweichenden Effekt des Hormons Relaxin auf die Zervix zu untersuchen, wurde ein *in vivo*-Versuch zur Bestimmung des Zervix-Innendurchmessers vor und nach lokaler Applikation von rekombinantem humanen (rh)Relaxin mittels speziell angefertigter Messröhrchen unter Allgemeinanästhesie der Tiere durchgeführt.

Desweiteren erfolgte die histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchung von Zervices weiblicher Weißbüschelaffen aus 3 unterschiedlichen Versuchsgruppen: 1) anatomisch und physiologisch intakte, zyklische Weißbüschelaffen, 2) intakte, lokal mit rhRelaxin behandelte Tiere und 3) zur Ausschaltung endogener Hormonquellen ovariectomierter Weißbüschelaffen, denen systemisch rhRelaxin oder 17 β -Östradiol bzw. eine Kombination beider Hormone verabreicht wurde sowie einer unbehandelten Kontroll-

gruppe. Die Organe wurden nach Entnahme geteilt. Ein Teil wurde für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen in 4%igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, wohingegen der andere Organteil für die molekularbiologischen Versuche kryokonserviert wurde.

Als histologische Färbemethoden wurden die Hämalaun-Eosin-Färbung für einen Überblick über die Morphologie der Zervix, die Masson-Trichrom- bzw. Pikrosiriusrot-Färbung zur Beurteilung der Struktur der kollagenen Fasern der Extrazellulären Matrix sowie die Siriusrot-Färbung zur spezifischen Darstellung der eosinophilen Granulozyten im Gewebe der Zervix durchgeführt. Weiterhin wurden durch die Methode der indirekten Immunhistochemie mittels spezifischer Antikörper die Expression der Östrogen- und Progesteronrezeptoren (ER α u. PR), des Östrogensynthese-Enzyms 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-7 (17 β HSD7), des Relaxins und des Relaxinrezeptors LGR7 sowie der kollagenolytischen Enzyme MMP-1, -2 und -9 dargestellt. Zur Ermittlung der Blutgefäßanzahl im zervikalen Stroma wurde die Darstellung mittels Anti-Aktin-Antikörpern angewendet.

Zur Ergänzung der immunhistochemischen Untersuchungen zur Proteinexpression der genannten Parameter wurde die Expression des ER α und PR, des LGR7, des Relaxins und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) auf mRNA-Ebene molekularbiologisch durch die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestimmt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen deutlich, dass sowohl Relaxin als auch Östradiol einen geweberemodulierenden Einfluss auf die Zervix besitzen, wobei vermutlich unterschiedliche Mechanismen einerseits für Relaxin und Östradiol und andererseits für lokal bzw. systemisch wirkendes Relaxin von Bedeutung sind.

Systemisch appliziertes Östradiol vermag die Sekretion des zervikalen Epithels, die Einwanderung von eosinophilen Granulozyten und die Expression von MMPs zu stimulieren. Es ist eine deutliche Auflockerung des Bindegewebes zu sehen. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen der intakten, zyklischen Tiere in der Östrogen-dominierten späten Follikelphase überein. Östradiol scheint weiterhin die Sensibilität des zervikalen Gewebes gegenüber Relaxin durch eine Stimulation der LGR7-Expression positiv zu beeinflussen.

Die Behandlung mit Relaxin zeigt deutliche Unterschiede zwischen lokaler und systemischer Hormoneinwirkung. Während eine systemische Relaxinapplikation durch Stimulation der LGR7-Expression im Gewebe die Wirkung lokal produzierten und auto- bzw. parakrin wirkenden Relaxins positiv zu modulieren scheint, ist v.a. nach lokaler Applikation dieses Hormons eine Erhöhung der Gefäßanzahl sowie eine deutliche Auflockerung des Bindegewebes zu sehen, die für eine Erweichung des Gewebes spricht, was durch die Erweiterung des Zervix-Innendurchmessers im *in vivo*-Versuch bestätigt werden konnte. Eine Kombination aus beiden Hormonen führte in bezug auf die untersuchten Parameter zu durchgehend positiven und teilweise die einzeln erzielten Wirkungen übertreffenden Ergebnissen. Dies lässt den Schluss zu, dass sich Relaxin und Östradiol in ihren Wirkungen auf die Zervix des Weißbüschelaffen gegenseitig ergänzen und bestätigt die Feststellung von HUANG et al. (1997), dass diese beiden Hormone einen synergistischen Effekt auf das Gewebe der Zervix haben, der v.a. während der Geburt eine Rolle spielt und hinsichtlich einer therapeutischen Anwendungen des Relaxins zur Geburtserleichterung bei den Primaten einschließlich des Menschen zu beachten wäre.

7 Summary

Christina Simon

Hormonally induced softening of the cervix in the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*).

Institute of Physiological Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in December 2004

(118 pp, 38 figures, 16 tables, 133 references, 3 pp. appendix with 1 table)

Keywords: cervix, relaxin, estradiol, Common Marmoset

The cervix as the caudal or lower part of the uterus plays an important role within the female reproductive tract during pregnancy and parturition. On the one hand it has to protect the intrauterine from the outside milieu and to hold the embryo or fetus in the uterine cavity. On the other hand the cervix has to soften and widen immediately during parturition to deliver the fetus (LEPPERT 1995; RATH et al. 1994; DANFORTH 1983).

For these opposed functions of the cervix an extreme tissue remodelling is essential, which is under endocrine control of hormones like estrogen, progesterone, prostaglandins, oxytocin and relaxin (LINDZEY u. KORACH 1999; BRYANT-GREENWOOD u. SCHWABE 1994).

The aim of the presented study was to give an overview of the effects of the hormones relaxin and estradiol on the cervical tissue of the Common Marmoset, a well established primate model in reproductive sciences. Especially changes in the structure of the extracellular matrix (ECM) of the connective tissue, the expression of collagenolytic enzymes (matrix metalloproteinases, MMPs), receptor expression and blood vessel supply in the cervix should be analysed using histological, immunohistochemical and molecular biological methods. Therefore on the one hand the effect of locally versus systemically applied recombinant human (rh) relaxin and on the other hand the effect of systemically applied rh relaxin versus systemically applied 17 β -estradiol as well as a combined effect of both hormones was to be investigated.

First an *in vivo* experiment was carried out to show directly the softening or widening effect of relaxin on the cervix by measuring the intracervical diameter with special tubes under anaesthesia before and after local relaxin treatment. Furthermore cervices from female marmosets of 3 different experimental groups were histologically, immunohistochemically and molecular biologically investigated: 1) anatomically and physiologically intact, cyclic Common Marmosets, 2) intact animals treated locally with rh relaxin and 3) ovariectomized animals systemically treated with rh relaxin, 17 β -estradiol or with a combination of both hormones as well as an untreated control group. After euthanasia the organs were taken and separated. One part was fixated in 4% formalin and embedded in paraffin for the histological and immunohistochemical experiments, the other part was conserved at -80°C for the molecular biological investigations.

To get an overview of the morphology of the cervix haematoxylin and eosin (H&E)-staining was used. Massons trichrom and picrosiriusred-stainings were used to investigate changes

in the ECM-structure, especially the collagen fibres, siriusred staining to show differences in the numbers of eosinophile granulocytes in the cervical tissue. Furthermore the indirect immunohistochemical method by means of specific antibodies was used to investigate the expression of estrogen and progesterone receptors (ER α , PR), the estrogen synthesizing enzyme 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase-7 (17 β HSD7), relaxin and the relaxin receptor (LGR7) as well as the collagenolytic enzymes MMP-1, -2 and -9. The number of blood vessels in the cervical tissue was determined using specific Actin-antibodies. The immunohistochemical results were completed by molecular biological investigation of the mRNA-expression of ER α , PR, LGR7, relaxin and the vascular endothelial growth factor (VEGF) using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

The results of the presented study show an explicit tissue remodelling effect of both hormones, relaxin and estradiol, whereas different mechanisms for relaxin and estradiol on the one hand and for local and systemically acting relaxin on the other hand could probably exist.

Systemically applied estradiol stimulates the secretion of the cervical epithelial cells, the immigration of eosinophile granulocytes and the expression of MMPs. An obvious loosening of the structure of the connective tissue is to be seen. These observations accord with the results from the intact, cyclic animals in the estrogene dominated late follicular phase. Estradiol further seems to have a positive impact on the sensibility of the cervical tissue towards relaxin by stimulating the expression of LGR7.

The treatment with rh relaxin shows significant differences between local and systemic hormone application. Systemically applied relaxin seems to induce LGR7-expression and a local relaxin synthesis in the cervical tissue as a mechanism for a positive regulation of local relaxin effects. After local application of rh-relaxin an increased number of blood vessels could be detected as well as a loosening of the connective tissue structure validating an increase in the cervical diameter in the *in vivo* experiment.

The combination of both hormones led to continuous positive and sometimes maximum results compared with the effects of relaxin and estradiol alone with regard to the investigated parameters.

In conclusion, relaxin and estradiol seem to interact in their effects on the cervical tissue thus proving the possibility to act synergistically, which is important in physiological situations, especially during the parturition, and for treatment with relaxin under birth for uncomplicated delivery in primates including humans.

8 Literaturverzeichnis

Anthony R. Relaxin, Mammalian. In: Knobil E, Neill J (Hrsg.). Encyclopedia of Reproduction. Vol.4, San Diego: Academic Press, 1999:215-23.

Bartsch O, Bartlick B, Ivell R. Relaxin signalling links tyrosine phosphorylation to phosphodiesterase and adenylyl cyclase activity. Mol Hum Reprod. 2001;7(9):799-809.

Bathgate R, Moniac N, Bartlick B, Schumacher M, Fields M, Ivell R. Expression and regulation of relaxin-like factor gene transcripts in the bovine ovary: differentiation-dependent expression in theca cell cultures. Biol Reprod. 1999;61(4):1090-8.

Bathgate RA, Samuel CS, Burazin TC, Gundlach AL, Tregear GW. Relaxin: new peptides, receptors and novel actions. Trends Endocrinol Metab. 2003;14(5):207-13.

Bathgate RA, Samuel CS, Burazin TC, Layfield S, Claasz AA, Reytomas IG, Dawson NF, Zhao C, Bond C, Summers RJ, Parry LJ, Wade JD, Tregear GW. Human relaxin gene 3 (H3) and the equivalent mouse relaxin (M3) gene. Novel members of the relaxin peptide family. J Biol Chem. 2002;277(2):1148-57.

Baumhoer D, Steinbrück I, Götz W. Spezielle Histologie. In: Kurzlehrbuch Histologie. 2. Auflage, München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 2003:91-282.

Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. Hum Reprod Update. 2000;6(3):225-36.

Benirschke K. Placenta: Implantation and Development. In: Knobil E, Neill J (Hrsg.). Encyclopedia of Reproduction. Vol. 2, San Diego: Academic Press, 1999:848-55.

Binder C, Hagemann T, Husen B, Schulz M, Einspanier A. Relaxin enhances in-vitro invasiveness of breast cancer cell lines by up-regulation of matrix metalloproteases. Mol Hum Reprod. 2002;8(9):789-96.

Bond CP, Parry LJ, Samuel CS, Gehring HM, Lederman FL, Rogers PA, Summers RJ. Increased expression of the relaxin receptor (LGR7) in human endometrium during the secretory phase of the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(7):3477-85.

Breeveld-Dwarkasing VNA, de Boer-Brouwer M, te Koppele JM, Bank RA, van der Weijden GC, Taverne MAM, van Dissel-Emiliani FMF. Regional differences in water content, collagen content and collagen degradation in the cervix of non-pregnant cows. Biol Reprod. 2003;69(5):1608-14.

Brennand JE, Calder AA, Leitch CR, Greer IA, Chou MM, MacKenzie IZ. Recombinant human relaxin as a cervical ripening agent. Br J Obstet Gynaecol. 1997;104(7):775-80.

Brummer O, Bohmer G, Hollwitz B, Flemming P, Petry K, U Kuhnle H. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation – an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol.* 2002;84(2):222-7.

Bryant-Greenwood GD, Schwabe C. Human relaxins: chemistry and biology. *Endocr.Rev.* 1994;15(1):5-26.

Burazin TC, Bathgate RA, Macris M, Layfield S, Gundlach AL, Tregear GW. Restricted, but abundant, expression of the novel rat gene-3 (R3) relaxin in the dorsal tegmental region of brain. *J.Neurochem.* 2002;82(6):1553-7.

Carr BR. Fetal-Placental Unit. In: Knobil E, Neill J (Hrsg.). *Encyclopedia of Reproduction.* Vol.2, San Diego: Academic Press, 1999:338-44.

Carroll B. A Comparative Summary of Nutritional Adaptions and Needs of Callitrichids and Application to Captive Management. In: Pryce C, Scott L, Schnell C (Hrsg.). *Marmosets and Tamarins in Biological and Biomedical Research. Proceedings of a Workshop.* Salisbury: DSSD Imagery, 1997:70-7.

Cullinan-Bove K, Koos RD. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology.* 1993; 133(2):829-37.

Curry TE Jr, Osteen KG. Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biol Reprod.* 2001;64(5):1285-96.

Dallenbach-Hellweg G, Poulsen H. *Atlas of Histopathology of the Cervix Uteri.* Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1990.

Danforth D. The Morphology of the Human Cervix. *Clin Obstet Gynecol.* 1983;26(1):7-13.

Dentzmann R, Bruckner-Tuderman L, Bruckner P. Binde- und Stützgewebe. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg.). *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 2003:753-87.

Döcke F. Kapitel 16: Keimdrüsen. In: Döcke, F (Hrsg.): *Veterinärmedizinische Endokrinologie.* 3. Auflage, Jena, Stuttgart: Fischer-Verlag, 1994:399-508.

Dschietzig T, Richter C, Bartsch C, Laule M, Armbruster FP, Baumann G, Stangl K. The pregnancy hormone relaxin is a player in human heart failure. *FASEB J.* 2001;15(12):2187-95.

Du XJ, Samuel CS, Gao XM, Zhao L, Parry LJ, Tregear GW. Increased myocardial collagen and ventricular diastolic dysfunction in relaxin deficient mice: a gender-specific phenotype. *Cardiovasc Res.* 2003;57(2):395-404.

- Einspanier A, Zarreh-Hoshyari-Khah MR, Balvers M, Kerr L, Fuhrmann K, Ivell R. Local relaxin biosynthesis in the ovary and uterus through the oestrous cycle and early pregnancy in the female marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Hum Reprod.* 1997;12 (6):1325-37.
- Einspanier A, Nubbemeyer R, Schlote S, Schumacher M, Ivell R, Fuhrmann K, Marten A. Relaxin in the marmoset monkey: secretion pattern in the ovarian cycle and early pregnancy. *Biol.Reprod.* 1999;61(2):512-520.
- Ellwood D. The hormonal control of connective-tissue changes in the uterine cervix in pregnancy and at parturition. *Biochem Soc Trans.* 1980;8(5):662-7.
- Fraser HM, Lunn SF. Nonhuman primates and female reproductive medicine. In: Weinbauer GF, Korte R (Hrsg.). *Reproduction in nonhuman primates, a model system for human reproductive physiology and toxicology.* 1999:27-59.
- Fraser HM, Lunn SF. Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate corpus luteum. *Reproduction.* 2001;121:355-62.
- Feige A, Rempen A, Würfel W, Caffier H, Jawny J. *Frauenheilkunde.* München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1997.
- Funk CR, DeMayo FJ. Progesterone Actions on Reproductive Tract. In: Knobil E, Neill JD (Hrsg.). *Encyclopedia of Reproduction.* Vol. 4, San Diego: Academic Press, 1999:6-16.
- Gao G, Herbert Z, Kong J, Gabrielson N, Mautz A, Wu D, Jirikowski GF, Caldwell JD. Estradiol control of expression and levels of estradiol-binding proteins in the medial preoptic area, medial hypothalamus and pituitary. *Neuroendocrinology.* 2003;78(2):61-71.
- Garber SL, Mirochnik Y, Brecklin CS, Unemori EN, Singh AK, Slobodskoy L, Grove BH, Arruda JA, Dunea G. Relaxin decreases renal interstitial fibrosis and slows progression of renal disease. *Kidney Int.* 2001;59(3):876-82.
- Geissmann T. *Vergleichende Primatologie.* Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2003.
- Hall JA, Cantley TC, Galvin JM, Day BN, Anthony RV. Influence of ovarian steroids on relaxin-induced uterine growth in ovariectomized gilts. *Endocrinology.* 1992;130(6):3159-66v.
- Hearn JP. Chapter 6: The Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). In: *Reproduction in New World Primates. New Models in Medical Science.* 1983:181-215.
- Heistermann M, Tari S, Hodges JK. Measurement of fecal steroids for monitoring ovarian function in New World primates, *Callitrichidae*. *Reprod fertile.* 1993; 99(1):243-51.
- Hisaw FL. Experimental relaxation of the pubic ligament of the guinea pig. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1926;23:661-3
- Hoffmann B. Gravidität, Geburt und Puerperium. In: Döcke F (Hrsg.). *Veterinärmedizinische Endokrinologie.* 3. Auflage, Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1994:509-46.

Hombach-Klonisch S, Buchmann J, Sarun S, Fischer B, Klonisch T. Relaxin-like factor (RLF) is differentially expressed in the normal and neoplastic human mammary gland. *Cancer*. 2000;89(11):2161-8.

Hsu SY, Nakabayashi K, Nishi S, Kumagai J, Kudo M, Sherwood OD, Hsueh AJ. Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science* 2002;295(5555):671-4.

Huang C, Li Y, Anderson LL. Stimulation of collagen secretion by relaxin and effect of oestrogen on relaxin binding in uterine cervical cells of pigs. *J Reprod Fertil*. 1993;98(1):153-8.

Huang CJ, Li Y, Anderson LL. Relaxin and estrogen synergistically accelerate growth and development in the uterine cervix of prepubertal pigs. *Anim Reprod Sci*. 1997;46(1-2):149-58.

Husen B, Adamski J, Bruns A, Deluca D, Fuhrmann K, Moller G, Schwabe I, Einspanier A. Characterization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7 in reproductive tissues of the marmoset monkey. *Biol Reprod*. 2003;68(6):2092-9.

Irving-Rodgers HF, Bathgate RA, Ivell R, Domagalski R, Rodgers RJ. Dynamic changes in the expression of relaxin-like factor (INSL3), cholesterol side-chain cleavage cytochrome p450, and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in bovine ovarian follicles during growth and atresia. *Biol Reprod*. 2002;66(4):934-43.

Ivell R, Balvers M, Pohnke Y, Telgmann R, Bartsch O, Milde-Langosch K, Bamberger AM, Einspanier A. Immunoexpression of the relaxin receptor LGR7 in breast and uterine tissues of humans and primates. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1(1):114-27.

Ivell R, Bathgate RA. Reproductive biology of the relaxin-like factor (RLF/INSL3). *Biol Reprod*. 2002;67(3):699-705.

Ivell R, Einspanier A. Relaxin peptides are new global players. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13(8):343-8.

Iwahashi M, Muragaki Y, Ooshima A, Umesaki N. Decreased type I collagen expression in human uterine cervix during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(5):2231-5.

Jaffe RB. Kapitel 27: Neuroendocrine-metabolic regulation of pregnancy. In: Yen SSC, Jaffe RB, Babieri RL (Hrsg.). *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology and clinical management*. 4. Auflage, Philadelphia, London, Toronto: W.B. Saunders Company; 1999:751-78.

Jung H. Reifungsprozesse der Zervix uteri und ihre Bedeutung für die Geburt. *Z Geburtshilfe Perinatol*. 1984;188:1-6.

Junqueira LCU, Zugaib M, Montes GS, Toledo OMS, Krisztán RM, Shigihara KM. Morphologic and histologic evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilation. *Am J Obstet Gynecol.* 1980;138(3):273-81.

Kapit W, Macey RI, Meisami E. Fortpflanzung. In: *Physiologie-MalAtlas*. München: Arcis Verlag GmbH, 1992:141-53.

Knörr K, Knörr-Gärtner H, Beller F, Lauritzen C. *Geburtshilfe und Gynäkologie*. 3. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1989.

Koch T, Berg R. Harn- und Geschlechtsapparat, Apparatus urogenitalis. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Band III: Eingeweidelehre (Splanchnologie). 4. Auflage, Jena: Gustav Fischer Verlag, 1990:253-350.

Kohsaka T, Hamano K, Sasada H, Watanabe S, Ogine T, Suzuki E, Nishida S, Takahara H, Sato E. Seminal immunoreactive relaxin in domestic animals and its relationship to sperm motility as a possible index for predicting the fertilizing ability of sires. *Int J Androl.* 2003;26(2):115-20.

Krajnc-Franken MAM, van Disseldorp AJM, Koenders JE, Mosselman S, van Duin M, Gossen JA. Impaired Nipple Development and Parturition in LGR7 Knockout Mice. *Mol Cell Biol.* 2004;24(2):687-96.

Kramer SM, Gibson UE, Fendly BM, Mohler MA, Drolet DW, Johnston PD. Increase in cyclic AMP levels by relaxin in newborn rhesus monkey uterus cell culture. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990;26(6):647-56.

Krusche CA, Moller G, Beier HM, Adamski J. Expression and regulation of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 7 in the rabbit. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;171(1-2):169-77.

Kuenzi MJ, Sherwood OD. Immunohistochemical localization of specific relaxin-binding cells in the cervix, mammary glands, and nipples of pregnant rats. *Endocrinology.* 1995;136(4):1367-73.

Kühnel W. Weibliche Geschlechtsorgane. In: *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie*. 9. Auflage, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1995:374-403.

Kulikov VI, Muzya GI. The bioregulatory role of platelet-activating factor in intracellular processes and cell-cell interactions. *Biochemistry (Mosc).* 1998;63(1):47-54.

Künzel W. *Geburt I*. 4. Auflage, München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 2003.

Kutteh WH, Moldoveanu Z, Mestecky J. Mucosal immunity in the female reproductive tract: correlation of immunoglobulines, cytokines, and reproductive hormones in human cervical mucus around the time of ovulation. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998;14(Suppl 1):51-5.

Lenhart JA, Ryan PL, Ohleth KM, Palmer SS, Bagnell CA. Relaxin increases secretion of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 during uterine and cervical growth and remodeling in the pig. *Endocrinology*. 2001;142(9):3941-9.

Lenhart JA, Ryan PL, Ohleth KM, Palmer SS, Bagnell CA. Relaxin increases secretion of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and -2 during uterine and cervical growth and remodeling in the pig. *Endocrinology*. 2002;143(1):91-8.

Leonhardt H. Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. 8. Auflage, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1990.

Leppert P. Anatomy and Physiology of cervivcal Ripening. *Clin Obstet Gynecol*. 1995; 38(2):267-79.

Leppert PC, Keller S, Cerreta J, Hosannah Y, Mandl I. The content of elastin in the uterine cervix. *Arch Biochem Biophys*. 1983;222(1):53-8.

Liebich HG. Kapitel XIV: Weibliche Geschlechtsorgane. In: Funktionelle Histologie. 2. Auflage, Stuttgart: Schattauer GmbH, 1983:255-73.

Lindzey J, Korach KS. Estrogen Action on the female Reproductive Tract. In: Knobil E, Neill J (Hrsg.). *Encyclopedia of Reproduction*, Vol.2, San Diego: Academic Press, 1999: 79-86.

Löffler G, Kellerer M, Häring HU. Endokrine Funktionen III. Die schnelle Stoffwechsel-regulation. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg.). *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 2003:837-64.

Lunn, SF. The Relative Merits of the Marmoset as a Model in Reproductive Medicine. In: Pryce C, Scott L, Schnell (Hrsg.). *Marmosets and Tamarins in Biological and Biomedical Research*. Proceedings of a Workshop. Salisbury: DSSD Imagery, 1997:192-207

Luque EH, Munoz de Toro MM, Ramos JG, Rodriguez HA, Sherwood OD. Role of relaxin and estrogen in the control of eosinophilic invasion and collagen remodeling in rat cervical tissue at term. *Biol Reprod*. 1998;59(4):795-800.

Mackler AM, Iezza G, Akin MR, McMillan P, Yellon SM. Macrophage trafficking in the uterus and cervix precedes parturition in the mouse. *Biol Reprod*. 1999;61:879-83.

Malassine A, Cronier L. Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine*. 2002;19(1):3-11.

- Masuda S, Kobayashi T, Chikuma M, Nagao M, and Sasaki R. The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;278:E1038-44.
- Maul H, Shi L, Marx SG, Garfield RE, Saade GR. Local application of platelet-activating factor induces cervical ripening accompanied by infiltration of polymorphonuclear leukocytes in rats. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187(4):829-33.
- Moghissi K. Cervix. In: Knobil E, Neill J (Hrsg.). *Encyclopedia of Reproduction*, Vol.1, San Diego: Academic Press, 1999: 546-53.
- Mushayandebvu TI, Rajabi MR. Relaxin stimulates interstitial collagenase activity in cultured uterine cervical cells from nonpregnant and pregnant but not immature guinea pigs; estradiol-17 beta restores relaxin's effect in immature cervical cells. *Biol Reprod.* 1995;53(5):1030-7.
- Nathanielsz P. Endocrine mechanisms of parturition. *Ann Rev Physiol.* 1978;40:411-45.
- Nef S, Parada LF. Cryptorchidism in mice mutant for *Ins13*. *Nat Genet.* 1999;22(3):295-9.
- Nistri S, Bani D. Relaxin receptors and nitric oxide synthases: search for the missing link. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1(1):5.
- Noll S, Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie*. 1. Auflage, München, Jena: Urban und Fischer Verlag, 2000.
- Nubbemeyer R, Heistermann M, Oerke AK, Hodges JK. Reproductive efficiency in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): a longitudinal study from ovulation to birth monitored by ultrasonography. *J Med Primatol.* 1997;26(3):139-46.
- Palejwala S, Stein DE, Weiss G, Monia BP, Tortoriello D, Goldsmith LT. Relaxin positively regulates matrix metalloproteinase expression in human lower uterine segment fibroblasts using a tyrosine kinase signaling pathway. *Endocrinology.* 2001;142(8):3405-13.
- Palejwala S, Tseng L, Wojtczuk A, Weiss G, Goldsmith LT. Relaxin gene and protein expression and its regulation of procollagenase and vascular endothelial growth factor in human endometrial cells. *Biol Reprod.* 2002;66(6):1743-8.
- Petersen LK, Vogel I, Agger AO, Westergaard J, Nils M, Ulbjerg N. Variations in serum relaxin (hRLX-2) concentrations during human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol Scand.* 1995;74(4):251-6.
- Petrides P. Endokrine Funktionen IV. Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg.). *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 2003:865-908.

Pillai SB, Rockwell LC, Sherwood OD, Koos RD. Relaxin stimulates uterine edema via activation of estrogen receptors: blockade of its effect using ICI 182,789, a specific estrogen receptor antagonist. *Endocrinology*. 1999;140(5):2426-9.

Pillai SB, Jones JM, Koos RD. Treatment of rats with 17 β -estradiol or relaxin rapidly inhibits uterine estrogen receptor β 1 and β 2 messenger ribonucleic acid levels. *Biol Reprod*. 2002;67:1919-26.

Qin X, Garibay-Tupas J, Chua PK, Cachola L, Bryant-Greenwood GD. An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. I. Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) and tissue plasminogen activator. *Biol Reprod*. 1997;56(4):800-11(a).

Qin X, Chua PK, Ohira RH, Bryant-Greenwood GD. An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. II. Stromelysin- 1 (MMP-3) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1). *Biol Reprod*. 1997;56(4):812-20(b).

Ramos JG, Varayoud J, Kass L, Rodriguez H, Munoz de Toro M, Montes GS, Luque EH. Estrogen and progesterone modulation of eosinophilic infiltration of the rat uterine cervix. *Steroids*. 2000;65:409-14.

Rath W, Osmers R, Stuhlsatz HW, Adelmann-Grill BC. Biochemische Grundlagen der Zervixreifung und Muttermundseröffnung. *Z Geburtshilfe Perinatol*. 1994;198(5-6):186-95.

Reibiger I, Spanel-Borowski K. Difference in localization of eosinophils and mast cells in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*. 2000;118(2):243-9.

Richter J, Götze R. Tiergeburtshilfe. 4. Auflage, Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey, 1993.

Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark RF. Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. *Biol Reprod*. 1996;54 (1):183-96.

Romeis B. Untersuchung des Binde- und Stützgewebes. In: Böck P (Hrsg.). *Mikroskopische Technik*. 17. Auflage, München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg, 1989:491-566.

Rowe N. Neotropical primates. In: *The Pictorial Guide to the Living Primates*. Charlestown, Rhode Island: Pogonias Press, 1996:59-117(a).

Rowe N. Old World Monkeys. In: *The Pictorial Guide to the Living Primates*. Charlestown, Rhode Island: Pogonias Press, 1996:119-205(b).

Rowe AJ, Wulff C, Fraser HM. Localization of mRNA for vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietins and their receptors during the peri-implantation period and early pregnancy in marmosets (*Callithrix jacchus*). *Reproduction*. 2003;126:227-38.

Samuel CS, Parry LJ, Summers RJ. Physiological or pathological - a role for relaxin in the cardiovascular system? *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3(2):152-8(a).

Samuel CS, Zhao C, Bathgate RAD, Bond CP, Burton MD, Parry LJ, Summers RJ, Tang MLK, Amento EP, Tregear GW. Relaxin deficiency in mice is associated with an age-related progression of pulmonary fibrosis. *FASEB J.* 2003;17(1):121-3(b).

Sanborn BM, Kuo HS, Weisbrodt NW, Sherwood OD. The interaction of relaxin with the rat uterus. I. Effect on cyclic nucleotide levels and spontaneous contractile activity. *Endocrinology.* 1980;106(4):1210-5.

Schnorr B. Plazentation beim Säuger und Embryonalhüllen beim Vogel. In: *Embryologie der Haustiere*, 3. Auflage, Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1996:66-99.

Scobie GA, Macpherson S, Millar MR, Groome NP, Romana PG, Saunders PT. Human oestrogen receptors: differential expression of ER alpha and beta and the identification of ER beta variants. *Steroids.* 2002;67(12):985-92.

Sehdev HM. Puerperium. In: Knobil E, Neill J (Hrsg.). *Encyclopedia of Reproduction*, Vol.4, San Diego: Academic Press, 1999:164-71.

Sennström M, Brauner A, Byström B, Malmström A, Ekman G. Matrix metalloproteinase-8 correlates with the cervical ripening process in humans. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003;82:904-11.

Siebel AL, Gehring HM, Reytomas IG, Parry LJ. Inhibition of oxytocin receptor and estrogen receptor-alpha expression, but not relaxin receptors (LGR7), in the myometrium of late pregnant relaxin gene knockout mice. *Endocrinology.* 2003;144(10):4272-5.

Silbernagl S, Despopoulos A. Endokrines System und Hormone. In: *Taschenatlas der Physiologie*, 4. Auflage, Stuttgart, New York, München: Georg Thieme Verlag, Deutscher Taschenbuchverlag, 1991:232-71.

Smiths CL. Estrogenes, Overview. In: Knobil E, Neill J (Hrsg.). *Encyclopedia of Reproduction*, Vol. 2, San Diego: Academic Press, 1999: 119-26.

Stjernholm Y, Sahlin L, Eriksson H, Byström B, Stenlund P, Ekman G. Cervical ripening after treatment with prostaglandin E2 or antiprogesterone (RU486). Possible mechanisms in relation to gonadal steroids. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999;84(1):83-8.

Stygar D, Wang H, Sjöström Y, Ekman G, Eriksson H, Sahlin L. Increased Level of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in the Ripening Process of the Human Cervix. *Biol Reprod.* 2002;67:889-94.

Sudo S, Kumagai J, Nishi S, Layfield S, Ferraro T, Bathgate RA, Hsueh AJ. H3 relaxin is a specific ligand for LGR7 and activates the receptor by interacting with both the ectodomain and the exoloop 2. *J.Biol.Chem.* 2003;278(10):7855-62.

Sugano T, Narahara H, Nasu K, Arima J, Fujisawa K, Miyakawa I. Effects of platelet-activating factor on cytokine production by human uterine cervical fibroblasts. *Mol Hum Reprod.* 2001;7(5):475-81.

Summers PM, Wennink CJ, Hodges JK. Cloprostenol-induced luteolysis in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J Reprod Fertil.* 1985;73(1):133-8.

Tan YY, Wade JD, Tregear GW, Summers RJ. Quantitative autoradiographic studies of relaxin binding in rat atria, uterus and cerebral cortex: characterisation and effects of estrogen treatment. *Br J Pharmacol.* 1999;127:91-8.

Tanaka K, Nakamura T, Takagaki K, Funahashi M, Saito Y, Endo M. Regulation of hyaluronate metabolism by progesterone in cultured fibroblasts from the human uterine cervix. *FEBS letters.* 1997;402:223-6.

Tashima LS, Mazoujian G, Bryant-Greenwood GD. Human relaxins in normal, benign and neoplastic breast tissue. *Mol Endocrinol.* 1994;12(3):351-64.

Torii R, Koizumi H, Tanioka Y, Inaba T, Mori J. Serum LH, Progesterone and Estradiol-17 β Levels Throughout the Ovarian Cycle, During Pregnancy and after the Parturition and the Abortion in the Common Marmoset, *Callithrix jacchus*. *Primates.* 1987;28 (2):229-38.

Unemori EN, Amento EP. Relaxin modulates Syntheses and Secretion of Procollagenase and Collagen by Human Dermal Fibroblasts. *J Biol Chem.* 1990;265(18):10681-5.

Unemori EN, Erikson ME, Rocco SE, Sutherland KM, Parsell DA, Mak J, Grove BH. Relaxin stimulates expression of vascular endothelial growth factor in normal human endometrial cells in vitro and is associated with menometrorrhagia in women. *Hum Reprod.* 1999;14(3):800-6.

Vogel I, Salvig JD, Secher NJ, Uldbjerg N. Association between raised serum relaxin levels during the eighteenth gestational week and very preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184(3):390-3.

Wang H, Stjernholm Y, Ekman G, Eriksson H, Sahlin L. Different regulation of oestrogen receptors alpha and beta in the human cervix at term pregnancy. *Mol Hum Reprod.* 2001;7(3):293-300.

Wendt H. Springtamarins und Krallenäffchen. In: Grzimek B (Hrsg.). *Grzimeks Tierleben. Enzyklopädie des Tierreichs, Band 10. Säugetiere 1.* München: Deutscher Taschenbuchverlag, 1993: 348-78.

Winkler M, Rath W. Changes in the cervical extracellular matrix during pregnancy and parturition. *J Perinat Med.* 1999;27(1):45-60.

Winn RJ, Baker MD, Sherwood OD. Individual and combined effects of relaxin, estrogen, and progesterone in ovariectomized gilts. I. Effects on the growth, softening, and histological properties of the cervix. *Endocrinology*. 1994;135(3):1241-9.

Woessner J, Nagase H. *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. Oxford: University Press, 2000.

Yasuda K, Johnston JM. The hormonal regulation of platelet-activating factor-acetylhydrolase in the rat. *Endocrinology*. 1992;130(2):708-16.

Yoshinaga K. Estrogen Secretion, Regulation of. In: Knobil E, Neill J (Hrsg.). *Encyclopedia of Reproduction*, Vol.2, San Diego: Academic Press, 1999:108-18.

Zhou Y, Bellingard V, Feng KT, McMaster M, Fisher SJ. Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang2, PlGF, and VEGF-C. *Developmental Biology*. 2003;263:114-25.

- A -

9 Anhang

Eosin-Lösung

0,5 g Eosin (Merck)

Lösen in 100 ml Aqua bidest

Vor Gebrauch Zugabe von einem Tropfen konzentrierter Essigsäure.

Siriusrot-Lösung

500 mg Sirius F3B (DyStar Textilfarben GmbH & Co., Frankfurt, Deutschland)

Lösen in 45 ml Aqua bidest

+ 50 ml reines 100% Ethanol (Roth)

+ 1 ml 1% NaOH

+ 4 ml 20% NaCl (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland) → tröpfchenweise zugeben bis Präzipitation sichtbar

Lösung über Nacht stehen lassen und am nächsten Tag vor Gebrauch filtern.

Pikrosiriusrot-Lösung

0,1 g Siriusrot F3B (DyStar)

Lösen in 100 ml gesättigter wässriger Pikrinsäure-Lösung (Sigma-Aldrich)

Weigerts Eisenhämatoxylin-Arbeitslösung

gleiche Anteile der kommerziellen Lösungen **A** und **B** (Sigma-Aldrich) mischen

Phosphomolybdän-Arbeitslösung

1 Anteil Phosphomolybdic-Lösung (Sigma-Aldrich)

1 Anteil Phosphotungstic-Lösung (Sigma-Aldrich)

2 Anteile Aqua bidest

→ mischen

Verdünnte Essigsäure

10 ml konzentrierte Essigsäure

verdünnen mit 22 ml Aqua bidest

Zitratpuffer

4,5 ml Zitronensäure (Mallinckrodt Baker)

20,5 ml Na-Zitrat (Roth)

mit PBS-Puffer auf 250 ml auffüllen

Der pH-Wert wird auf 6,0 eingestellt.

Die Lösung wird in einer Küvette im Sterilisator (Heraeus Typ UT 6 der Firma Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) auf 120°C erwärmt.

AEC-Substrat-Kit (Vektor)

1 Tropfen Puffer (Buffer pH 5,3)

1 Tropfen AEC Substrat Reagent

1 Tropfen H₂O₂

in 2 ml Aqua bidest tropfen und gut mischen;

Diese Lösung muss vor jedem Gebrauch frisch angesetzt werden.

Herkunft der Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Hersteller
ER	Euromedex, Souffelweyersheim, Frankreich
PR	Immunotech Vertriebsgesellschaft mbH Hamburg Deutschland
17βHSD7	Pineda Antikörper-Service, Berlin, Deutschland (HUSEN et al. 2003)
LGR7	Pineda Antikörper-Service, Berlin, Deutschland (IVELL et al. 2003)
RLX	Prof. O. D. Sherwood, University of Illinois at Urbana-Champaign, Dept. of Molecular and Integrative Physiology, Urbana, IL, USA
Aktin	Immunotech Vertriebsgesellschaft mbH Hamburg Deutschland
MMP-1	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
MMP-2	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
MMP-9	MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland

ERα: Östradiolrezeptor α, PR: Progesteronrezeptor, 17βHSD7: 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, LGR7: Relaxinrezeptor, RLX: Relaxin, MMP: Matrix-Metalloproteinase

TBE-Puffer

10xTBE:

108 g Tris-Base (Tris-Base ultra Qualität; Roth)

55 g Borsäure (Roth)

40 ml 0,5M EDTA (Mallinckrodt Baker)

Auffüllen mit Aqua bidest auf 1 Liter.

Diese Pufferstammlösung muss vor Gebrauch mit Aqua bidest 1:10 verdünnt werden.

- C -

Agarosegel 1,5%

1,05 g Agarose (SeaKem LE-Agarose; BMA, Rockland, USA)

70 ml TBE-Puffer pH = 8,0

Aufkochen in der Mikrowelle.

Nach leichtem Abkühlen Zugabe von 1µl Ethidiumbromid (1g/100 ml Aqua bidest).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Almuth Einspanier für die Überlassung des Dissertations-Themas, für die freundliche und konsequente Betreuung und Unterstützung sowie für die ständige konstruktive Diskussionsbereitschaft, die entschieden zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Ich danke am Deutschen Primatenzentrum Göttingen Herrn Prof. K. Hodges für die Überlassung des Arbeitsplatzes während der Zeit in Göttingen und für die Möglichkeit der Nutzung von Primaten für die Versuche. Mein Dank gilt insbesondere auch Kerstin Fuhrmann für die Möglichkeit, jedwedes histologische oder molekularbiologische Problem zu besprechen und für die „Ferndiagnosen“ nach dem Umzug nach Leipzig, die die schwierige Anfangsphase im neuen Institut merklich erleichterten, desweiteren Angelika Jurdzinski für die Einführung in die Histologie, Angela Brüns und Susanne Rensing für die Hilfe bei der Durchführung der *in vivo*-Versuche sowie bei der Betreuung der Versuchstiere und weiterhin den Doktoranden A. Brüns, Nicola Beindorff und Alessandra Quaggioi-Augusto sowie Frau Dr. Martina Blaschke für das angenehme Klima im „Doktorandenzimmer“, nette Gespräche neben der Arbeit und die vielen Informationen, die für das Anfertigen einer Doktorarbeit unabkömmlich sind.

Im Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut der Uni Leipzig bedanke ich mich besonders bei Marion Sohr und Anke Dettmer für die Unterstützung bei der Durchführung der histologischen und immunhistochemischen bzw. molekularbiologischen Untersuchungen.

Ein ganz großes Dankeschön gebührt hier Herrn Dr. Kai Lieder, der unermüdlich das eine oder andere PCR-Problem mit mir bewältigt und durch kritische Betrachtung des molekularbiologischen Teils der Arbeit einen großen Beitrag zu dessen Gelingen geleistet hat. Weiterhin wären an dieser Stelle auch die Doktoranden dieses Institutes, Anja Seidel, Nadine Rupp, Annett Zimmermann und Anja Gemeinhardt zu nennen, die neben guten Tipps für die Diss auch immer ein offenes Ohr und Lust zu einem Schwätzchen zwischendurch hatten.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. K. Spaniel-Borowski vom Anatomischen Institut der Universität Leipzig für die Durchführung der Siriusrot-Färbung bedanken.

Desweiteren bedanke ich mich bei Guido Stork für die Hilfe bei der Bearbeitung der Fotos.

An dieser Stelle möchte ich mich weiterhin bei Frau DVM Elke Berger und Signe Pade für die schöne Zeit in der Kleintierpraxis in Dessau bedanken, die mich in meinem Wunsch, Tierärztin zu werden, sehr bestärkt hat sowie für die andauernde Unterstützung und die Möglichkeit, auch während des Studiums über die Pflichtpraktika hinaus immer wieder ein wenig Praxisluft zu schnuppern.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und meiner Familie für ihr Interesse und ihre persönliche Unterstützung und v.a. meiner Schwester Steffi für die „Übersetzungshilfe“.